

Université de Montréal

Étude de l'activité de Staufen1 dans la régulation traductionnelle de certains ARNm

par

Samuel Dugré-Brisson

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Biochimie

Décembre 2008

© Samuel Dugré-Brisson, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude de l'activité de Staufen1 dans la régulation traductionnelle de certains ARNm

présentée par :

Samuel Dugré-Brisson

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Muriel Aubry, président-rapporteur
Luc DesGroseillers, directeur de recherche
Pascal Chartrand, membre du jury
François Bachand, examinateur externe
Nicole Leclerc, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le transport et la traduction localisée des ARN messagers sont observés chez plusieurs organismes et sont requis pour de multiples phénomènes tels la mémoire, la division cellulaire asymétrique et l'établissement des axes durant le développement. Staufen, une protéine liant l'ARN double-brin, a été identifiée dans un premier temps chez la mouche à fruits *Drosophila melanogaster*. Il a été montré, chez cet organisme, que Staufen est requis pour la localisation des messagers *bicoid* et *oskar* aux pôles antérieur et postérieur de l'ovocyte, respectivement. Également, Staufen est requis afin que la répression traductionnelle du messenger *oskar* soit levée une fois qu'il est bien localisé. Chez les mammifères, Stau1 est une protéine ubiquiste qui est présente dans des complexes prenant la forme de granules dans les dendrites des neurones. Également, Stau1 peut interagir de façon indépendante de l'ARN avec le ribosome et cofractionner tant avec la sous-unité 40S qu'avec la sous-unité 60S du ribosome dans un gradient de saccharose. L'implication de Stau1 dans un mécanisme permettant la dérégulation traductionnelle de certains ARNm chez les mammifères était donc une voie d'investigation intéressante.

Nous avons donc décidé de vérifier si Stau1 mammifère avait la capacité de stimuler la traduction d'un ARNm cellulaire via un mécanisme régulé. Au moment où cette thèse a été entreprise, aucun ARNm cellulaire lié par Stau1 n'avait été identifié chez les mammifères. Des structures d'ARN double-brin ont donc été employées afin de réprimer la traduction d'un ARNm rapporteur. C'est ainsi que nous avons montré que Stau1 peut stimuler la traduction d'un ARNm lorsqu'il lie celui-ci dans sa région 5' non-traduite. Par

la suite, en employant des micropuces d'ADN, nous avons identifié des messagers cellulaires dont la distribution dans les polysomes lourds est modifiée par Stau1. En effet, un groupe de messagers est enrichi dans les polysomes lourds suite à une surexpression de Stau1, ce qui suggère que Stau1 stimule la traduction de cette population d'ARNm.

Afin d'identifier un mécanisme potentiel de régulation de l'activité traductionnelle de Stau1, nous nous sommes intéressés à la capacité d'auto-association de cette protéine. Nous avons montré que Stau1, tout comme plusieurs protéines liant l'ARN double-brin, est en mesure de s'associer à lui-même, et ce, d'une façon indépendante de l'ARN. Nous avons identifié les déterminants impliqués mettant ainsi au jour un nouveau mécanisme pouvant influencer les activités cellulaires de Stau1.

Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent donc que Stau1 est en mesure de stimuler la traduction d'une sous-population précise d'ARN messagers au sein de la cellule permettant ainsi de jeter un regard nouveau sur l'implication de cette protéine dans divers phénomènes au sein de l'organisme.

Mots-clés : Stau1, ARN messenger, traduction, ARN double-brin, auto-association, domaine de liaison à l'ARN double-brin (dsRBD).

Abstract

Transport and local translation of RNA are found in several organisms and are required for multiple phenomena such as memory, asymmetric cell division and establishment of the axis during development. Staufen, a double-stranded RNA binding protein, was first identified in *Drosophila melanogaster*. In the fruitfly, it was shown that Staufen is required for the proper localization of the *bicoid* and *oskar* transcripts to the anterior and posterior ends of the oocyte, respectively. It was also found that Staufen is important for the translational derepression of *oskar* once it is adequately localized. In mammals, Stau1 is a ubiquitous protein found in granules in the dendrites of neurons. Also, Stau1 can bind the ribosome in a RNA-independent manner and cofractionates with both ribosomal subunits in a sucrose gradient. The implication of Stau1 in a mechanism allowing translational derepression of certain RNAs in mammals was therefore an interesting path to explore.

Accordingly, we decided to verify if mammalian Stau1 had the capacity to stimulate the translation of cellular RNAs through a regulated mechanism. When this thesis was initiated, no cellular RNA target of Stau1 had been identified in mammals. Therefore, double-stranded RNA structures were used to repress the translation of a reporter mRNA. With this model, we showed that Stau1 can stimulate the translation of a transcript when it is bound to its 5' UTR. With the use of DNA microarrays, we identified cellular mRNAs which distribution in heavy polysomes was altered by Stau1. When Stau1 is overexpressed,

this group of mRNAs is enriched heavy polysomes, suggesting a translational stimulation of this population by Stau1.

To identify a regulatory mechanism that could influence Stau1's translational activity, we studied the self-association capacity of this protein. We showed that Stau1, like several double-stranded RNA binding proteins, can self-associate in a RNA-independent manner. We have identified the determinants required for this interaction that as the potential to be important for the regulation of the cellular activities of Stau1.

The results presented in this thesis suggest that Stau1 can stimulate the translation of a specific subset of mRNAs in the cell, letting us look at Stau1's implication in different processes from a new point of view.

Keywords : Stau1, messenger RNA, translation, double-stranded RNA, self-association, double-stranded RNA binding domain (dsRBD).

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xii
Liste des sigles et abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xviii
1. Introduction	1
1.1. Introduction générale	2
1.1.1. Objectifs de la thèse	3
1.1.2. Survol de l'introduction	3
1.2. Le transport et la traduction localisée des ARNs messagers.....	4
1.2.1. Le changement de type sexuel chez <i>S. cerevisiae</i>	5
1.2.1.1. Le « locosome » d' <i>ASH1</i>	6
1.2.1.2. L'importance de la traduction pour la localisation d' <i>ASH1</i>	6
1.2.2. <i>oskar</i> dans l'ovocyte de <i>D. melanogaster</i>	7
1.2.2.1. Les premiers pas : l'épissage et l'export vers le cytoplasme	8
1.2.2.2. L'importance du cytosquelette	9
1.2.2.3. Les facteurs importants pour la localisation d' <i>oskar</i>	10
1.2.2.4. Le contrôle traductionnel d' <i>oskar</i>	11
1.2.3. La mémoire chez les mammifères.....	12
1.2.3.1. L'importance de la traduction pour la mémoire à long terme.....	13
1.2.3.2. Le transport des ARNs vers les dendrites	14
1.2.4. Un modèle général	15
1.3. La traduction et certains de ses mécanismes de régulation.....	17
1.3.1. L'initiation	18
1.3.2. L'élongation	20

1.3.3. La terminaison.....	22
1.3.4. La régulation de la traduction par des structures d'ARN.....	24
1.3.4.1. Les protéines de régulation du fer et les éléments de réponse au fer	26
1.3.4.2. La traduction des histones.....	28
1.4. La protéine Staufén	30
1.4.1. Description de la protéine Staufén	30
1.4.1.1. Le domaine de liaison à l'ARN double-brin.....	31
1.4.1.2. Organisation protéique de Staufén.....	34
1.4.1.3. La distribution intracellulaire de Stau1	36
1.4.2. Les partenaires protéiques de Stau1	37
1.4.3. Les rôles cellulaires connus de Staufén	40
1.4.3.1. La localisation d'ARN messagers.....	40
1.4.3.2. La mémoire	43
1.4.3.3. La dérépression de la traduction	44
1.4.3.4. La dégradation médiée par Stau1	45
1.4.4. Les ARNs associés à Stau1	46
1.5. L'importance de l'homodimérisation pour les fonctions cellulaires des protéines liant l'ARN.....	47
1.5.1. PKR et la régulation de la traduction	47
1.5.2. She2p et la localisation de l'ARN.....	50
1.5.3. ADAR et l'édition des ARNs messagers	51
1.5.4. ELAV et l'épissage	53
2. Hypothèses de travail	55
3. Résultats	57
3.1. Article 1 : Interaction of Staufén1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs	58
3.1.1. Mise en contexte	59
3.1.2. Abstract	62

3.1.3. Introduction	64
3.1.4. Materials and Methods	67
3.1.5. Results	75
3.1.6. Discussion	85
3.1.7. Reference List	90
3.1.8. Acknowledgements	96
3.1.9. Figure legends	98
3.1.10. Tables and Figures	106
3.2. Article 2: Stau1 stimulates translation of a select group of mRNAs in HEK293T cells	117
3.2.1. Mise en contexte	118
3.2.2. Summary	121
3.2.3. Introduction	123
3.2.4. Experimental procedures	127
3.2.5. Results and discussion	131
3.2.6. Acknowledgements	137
3.2.7. Reference list	139
3.2.8. Figures Legends	142
3.2.9. Tables and figures	145
3.3. Article 3: Characterization of the molecular determinants required for Staufen1 self-association	152
3.3.1. Mise en contexte	153
3.3.2. Synopsis	156
3.3.3. Introduction	158
3.3.4. Materials and methods	162
3.3.5. Results	168
3.3.6. Discussion	176
3.3.7. Acknowledgements	182

3.3.8. Figures Legends	184
3.3.9. References	190
3.3.10. Tables and figures	194
4. Discussion	204
4.1. Le mécanisme de régulation de la traduction par Stau1	205
4.1.1. Mise au jour du mécanisme.....	206
4.1.2. Régulation de la stabilité et de la traduction des ARNs, des fonctions antagonistes ?	209
4.1.3. Modèle traductionnel proposé.....	211
4.2. Le lien traductionnel de Stau1 avec des ARNm cellulaires.....	213
4.2.1. L'interaction avec les messagers.....	214
4.2.2. Le déplacement des ARNs dans le gradient a-t-il vraiment lieu dans les polysomes ?.....	215
4.3. L'auto-association de Stau1 et ses fonctions cellulaires.....	216
4.3.1. Dimères ou multimères ?	217
4.3.2. Régulation par l'auto-association.....	218
5. Conclusions	220
6. Bibliographie.....	222
7. Autorisations	240

Liste des tableaux

Introduction

Tableau I	Protéines portant des domaines de liaison à l'ARN double-brin.	32
Tableau II	Protéines associées avec les complexes contenant Stau1.	39

Résultats

Article 1

Table I	Oligonucleotides used to mutate the TAR sequence.	107
---------	--	-----

Article 2

Table I	List of genes enriched in polysomes of cells overexpressing Stau1	146
Table II	Summary of gene ontology of increased genes	147
Table III	Summary of gene ontology of decreased genes	148

Article 3

Table I	Primers used for PCR amplification of hSt1 domains	195
---------	--	-----

Liste des figures

Introduction

Figure 1	La localisation des ARNs messagers.	16
Figure 2	Les étapes de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes.....	19
Figure 3	L'élongation de la traduction chez les eucaryotes.	21
Figure 4	La terminaison de la traduction chez les eucaryotes.....	23
Figure 5	Structure de l'IRE et régulation traductionnelle de la Ferritin.....	27
Figure 6	Structure du dsRBD2 de Xlrpba en complexe avec l'ARN double-brin.	33
Figure 7	Représentation schématique des protéines Staufén.	35
Figure 8	Localisation des messagers <i>oskar</i> , <i>bicoid</i> et <i>prospero</i> chez la drosophile.....	41
Figure 9	Représentation schématique de l'activation de PKR par l'ARN double-brin..	49

Résultats

Article 1

Figure 1	Stau1 ⁵⁵ -HA ₃ increases translation of TAR-bearing transcripts in RL.....	108
Figure 2	Stau1 ⁵⁵ -HA ₃ increases translation of TAR- <i>Rluc</i> transcripts in HEK293T cells	109
Figure 3	Stau1 ⁵⁵ -mediated increase of TAR-bearing RNA translation is independent of PKR.....	110
Figure 4	Stau1 ⁵⁵ Δ2-his ₆ binds the TAR RNA structure <i>in vitro</i>	111
Figure 5	The Stau1 ⁵⁵ RNA-binding activity is required for TAR-bearing RNA translational regulation.....	112
Figure 6	Stau1 ⁵⁵ -HA ₃ -mediated translational upregulation does not involve RNA modification.....	113
Figure 7	Stau1 ⁵⁵ mutants unable to modulate TAR- <i>Rluc</i> translation are nevertheless associated with ribosomes.....	114

Figure 8	In the presence of Stau1 ⁵⁵ -HA ₃ , TAR-Rluc transcripts are shifted to fractions containing heavy polysomes.....	115
Figure 9	Binding of Stau155 to the 5' end increases translation of structure-repressed transcripts.....	116

Article 2

Figure 1	Polysomes microarray analysis of transfected cells.....	149
Figure 2	RT-PCR and qPCR validation of microarray experiments.....	150
Figure 3	RT-PCR amplification of selected mRNAs following immunoprecipitation.....	151

Article 3

Figure 1	Stau1 proteins form complexes <i>in vivo</i>	196
Figure 2	Stau1 self-associates in live cells as measured by BRET.....	197
Figure 3	Direct Stau1 interaction as detected by a pull down assay.....	198
Figure 4	Schematic representation of the Stau1 mutants.....	199
Figure 5	Stau1 proteins self-associate via their dsRBDs 2 and dsRBD5.....	200
Figure 6	Summary of the BRET ratios in relation to two putative models of Stau1 self-association.....	201
Figure 7	Protein-protein interaction as measured by the yeast two-hybrid system.....	202
Figure 8	Schematic representation of the putative interaction between Stau1 dimer and double-stranded RNA.....	203

Discussion

Figure 1	Modèle de stimulation traductionnelle par la protéine Stau1.....	212
----------	--	-----

Liste des sigles et abréviations

ADAR : Déaminase d'adénosine agissant sur l'ARN double-brin

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARE : Élément AU riche

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNt : ARN de transfert

ASH1 : Synthèse asymétrique de HO

ATP : Adénosine triphosphate

BRE : Élément de réponse à Bruno

BRET : Transfert d'énergie biolumineuse par résonance

CPEB : Protéine liant l'élément de cytoplasmique de polyadénylation

CT : Complexe ternaire

dsRBD : Domaine de liaison à l'ARN double-brin

DTE : Élément de ciblage aux dendrites

eIF : Facteur d'initiation eucaryote

ELAV : Système visuel anormal embryonnaire léthal

E-LTP : LTP précoce

FMDV : Virus de la maladie du pied et de la bouche

FMRP : Protéine du retard mental lié au X fragile

GFP : Protéine fluorescente verte

GMC : Cellule mère du ganglion

GTP : Guanosine triphosphate

HIV-1 : Virus d'immunodéficience humaine de type I

IP : Immunoprécipitation

IRE : Élément de réponse au fer

IRES : Site d'entrée interne du ribosome

IRP : Protéine de régulation du fer

kDa : Kilodalton

L-LTP : LTP tardive

LTP : Potentiation à long terme

Met-_iARNt : ARNt méthionine initiateur

MT : Microtubules

NaN₃ : Azide de sodium

NLS : Signal de localisation nucléaire

NMD : Dégradation médiée par le non-sens

PABP : Protéine de liaison au poly-A

p-bodies : Corps processifs

PKA : Protéine kinase A

PKR : Protéine kinase R

PP1 : Protéine phosphatase 1

RHA : ARN hélicase A

Rluc : *Renilla* luciférase

RNP : Complexe ribonucléoprotéique

RRM : Motif de reconnaissance de l'ARN

SBS : Site de liaison à Stau1

shRNA : Petits ARNs en épingle à cheveux

siRNA : Petits ARNs interférants

SLBP : Protéine de liaison à la tige-boucle

SMD : Dégradation médiée par Stau1

Stau1 : Staufen1

Stau2 : Staufen2

TAR : Élément de réponse de *trans*-activation

TBD : Domaine de liaison à la Tubuline

UTR : Région non traduite

*À mes parents, Pierre et Johanne, et à mon
épouse, Élise, pour leur soutien constant et
inconditionnel.*

Remerciements

Bon, c'est la fin. En effet, j'ai composé ces lignes une fois que tout le reste fut terminé. C'est finalement un Samuel assez satisfait et peut-être même un peu ému qui a écrit tout ça. Ce sont donc les remerciements sincères d'un gars qui a l'impression d'avoir beaucoup grandi au cours de ses études graduées.

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Luc DesGroseillers. Premièrement pour m'avoir accepté dans son laboratoire il y a de ça plus de 6 ans mais également pour sa disponibilité et son ouverture d'esprit. Je tiens également à souligner la capacité de Luc à voir du positif dans des résultats que l'on juge parfois sans intérêt ou carrément nuls. Ça aide à remonter le moral quand on est découragé.

Ensuite, je remercie les membres de mon comité de thèse qui m'ont accompagné dans mes recherches depuis le tout début et qui furent également présents lors de mon examen pré-doctoral. Ces professeurs m'ont aidé par leurs suggestions à orienter mes études et m'ont posé des questions pertinentes qui m'ont permis de voir les choses d'un autre oeil. Dr Léa Brakier-Gingras et Dr Pascal Chartrand, merci.

Il est important pour moi de souligner l'excellent travail des employés du département. Plus spécifiquement, je remercie Mireille Fyfe pour les nombreux séquençages, Louise Cournoyer pour m'avoir passer des milliards de cellules « Bcm4 » et Sylvie Beauchemin pour avoir répondu à toutes les questions plates que j'ai eues.

Je remercie également les membres du jury d'évaluation de ma thèse pour avoir accepté avec enthousiasme de la lire.

Je remercie le FRSQ, le CRSNG et la faculté de Études Supérieures de l'université de Montréal pour le financement.

Passons maintenant à la partie collègues étudiants de mes remerciements.

Frédérique Badeaux : Merci pour ta motivation sans borne en ce qui concerne les commandes d'oligos. C'est surprenant parfois mais c'est très efficace.

Céline Fréchina : Merci pour la gestion des stocks d'anticorps et pour ta gentillesse à mon égard.

Gabriel Lapointe : Merci de ne pas ronfler en congrès et d'avoir été ma personne ressource en ce qui concerne la microscopie, sans toi je n'aurais eu que des photos de taches vertes.

Willdriss Viranaicken : Merci pour ton expertise scientifique qui semble être sans limite. Tu as toujours été de bon conseil, j'ai bien apprécié.

Véronique Trépanier. : Merci d'avoir été la présidente de l'AECSBUM quand personne ne voulait l'être. Je n'ai qu'un seul regret, ne pas avoir réussi à te faire manger du poisson. Merci aussi pour tes guides de voyage que j'ai utilisés, les discussions et *and I thinnnnnnnk ooooof youuuuuuuu*.

Sacha Blain : Merci d'avoir partagé quelques moments de chiâlage en ma compagnie. Lâches pas la patate.

Martin Pellicelli : Le gars du Lac, la tourtière de ta grand-mère m'a coupé l'appétit pendant 2 jours mais c'est la meilleure que j'ai mangée.

Linda Huang : *Hey Linda, do you eating ?* Merci d'avoir été une des personnes les plus difficile à saisir que j'aurai eu la chance de rencontrer. I hope you'll get your wedding ring that's worth 4 months of salary, even though I think it's really insane. Dont' forget : "You and Marjolaine with me in the middle" and "UV rays cannot go through the window glass, your DNA is safe".

Maria Sanchez : Thank you for borrowing my plasmids, it helped me keep my boxes in a not too chaotic state. It was pleasant chatting with you about Mexico.

George Elvira: Celui qui fut mon superviseur lorsque je suis arrivé. Tu as toujours répondu à mes questions et tu posais toujours la question à 100\$: Qu'est-ce qu'il manque pour faire un papier ? Je m'en souviens encore.

Nicolas Paquin : Merci pour ton aide constante lorsque j'ai eu à travailler avec des levures, tu m'as grandement facilité la tâche. Principalement quand tu m'as montré qu'on peut faire une transfo de levures à partir d'une colonie alors que je faisais des cultures liquides de 500 ml...

Luc Furic : Une encyclopédie sur 2 pattes. Très impressionnant parce que c'était sur beaucoup de sujets.

Catherine Martel : Une fille agréable à côtoyer même si ça commence à faire un bon bout de temps. On avait eu du fun avec Marjo à mon premier party de Noël du département.

Demian Barbas : Celui qui niaissait toujours Marjo dans le labo et qui disait toujours « basically » quand il présentait en anglais. Merci pour les lifts et pour les discussions sur le CH.

Viennent ensuite les gens faisant partie de ce que j'ai moi-même baptisé tout récemment le « A-500 crew ». Pas tous du même labo que moi mais qui étaient dans l'aile A-500 et qui avec les années sont devenus des amis très chers.

Karine, merci pour ton intensité tant en ce qui concerne le labo que la vie en général. J'ai toujours bien du plaisir avec toi et je garde beaucoup de beaux souvenirs. Merci de me permettre de partager mon intérêt pour les recettes de « Ric » sans avoir trop l'air fou. J'ai toujours admiré tes capacités de scientifique au plus haut point. Merci d'avoir travaillé avec moi sur presque tout ce que j'ai touché dans le labo. Je t'en suis très

reconnaissant. Merci aussi pour toutes les discussions que nous avons eues ensemble. Tu es la meilleure fan féminine du CH que j'ai connue.

Laurent, je sais que tu en as parlé dans ta thèse mais je ne peux passer sous silence l'épisode Google image et ED-209 (suggestion au lecteur : ne pas essayer). Je m'en rappelle (malheureusement) encore. C'est toi qui m'as fait goûter à une tartiflette pour la première fois. Tu es mon cinéphile préféré même si tu es venu de France pour voler nos femmes et nos jobs et que tu joues pas mal trop au volley.

Mathieu, le premier gars que j'ai rencontré qui en connaissait pas mal plus que moi sur le hockey. J'ai ensuite réalisé que tu en connaissais autant sur le baseball et ça m'a surpris (peut-être même effrayé) mais maintenant je comprends parfaitement. Tu es un des gars que je connais qui cuisine le mieux et c'est amusant de pouvoir parler de char avec toi et d'avoir l'air de connaître ça parce qu'on a suivi un cours et qu'on connaît des mots clés. Je te trouverai de la bière dans un 2 litres de liqueur. Je n'oublierai jamais ton Cowboy's plate à Rochester.

Frédéric, tu m'as permis de découvrir Huntingdon et Valleyfield, les joyaux de la Montérégie avec Napierville, ma ville d'adoption. Je pense souvent aux grillades de ton père qui sont si succulentes. Tu m'as fait retourner dans un des vices de mon adolescence, vice que je tairai afin que nous gardions tous les deux notre crédibilité d'hommes matures.

Véronique, merci d'avoir accompagné ma femme dans cette équipée menant au chalet à la pluie battante. Merci également de te faire l'entremetteuse afin que nous puissions nous rencontrer tous plus souvent malgré les chemins divergents. Et souviens-toi que « ça grandit vite à cet âge-là » !

Marjolaine, md, que dire ? Celle qui a été la première à véritablement comprendre mon humour dans le labo. Nous avons eu plusieurs moments drôles ensemble. Je te considère ma confidente même si la majorité de mes confidences m'ont été extirpées alors

que j'étais dans un état ne me permettant pas de me défendre afin de garder mon intimité pour moi seul (principalement aux partys de Noël). C'est ainsi que tout le monde a su qu'Élise était « la femme de ma vie parce qu'avoir un chat ensemble, ça veut dire quelque chose ». Sérieusement, merci pour tes conseils et ton écoute. Une suggestion : réponds à tes email !

J'aimerais également remercier « mon oncle préféré du côté de mon père », Jean-Maurice (Ménonc). Je me compte chanceux d'avoir quelqu'un comme toi au sein de ma famille. Tu auras été une personne importante pour moi au cours de ces années.

Je dois également beaucoup à mes beaux-parents, Judith et Raymond qui m'ont appuyé dans mes décisions depuis que je suis avec Élise. Merci.

J'ai une pensée pour mon « petit » frère Renaud (Ti-Pet), mon bon ami Manu, Grand-père et Grand-maman (qui fait les meilleurs pâtés à la viande, point final !). Tous sont (ou furent) très importants pour moi.

J'aimerais rendre hommage à mes parents, Johanne (Méman) et Pierre (Pépa), qui m'ont supporté tout au long de mes études et qui m'ont appuyé et soutenu lorsque j'en ai eu le plus besoin. Je n'oublierai jamais. Ce n'est pas pour rien que cette thèse vous est dédiée.

Finalement, la dernière et certainement pas la moindre, la femme de ma vie, ma belle Élise, que j'ai rencontrée sur les bancs de bois de l'Université de Montréal il y a quelques années. Merci d'avoir été là, merci de me comprendre, merci de me trouver drôle et surtout merci d'être toi.

Bon, il y en a pas mal plus que ce que j'aurais pensé mais ça prouve à quel point je suis reconnaissant à votre égard. Merci encore à tout le monde,

Samuel

1. Introduction

1.1. Introduction générale

L'ADN est transcrit en ARN qui sera à son tour traduit en protéine. Tel est le « dogme central » de la biologie moléculaire qui fut énoncé pour la première fois en 1958 par Francis Crick (Crick, 1970; Crick, 1958). Plusieurs exceptions à ce qui était à l'époque une hypothèse ont été découvertes et étudiées au cours des années. Par contre, le « dogme » demeure tout de même de nos jours une base permettant de comprendre la transmission de l'information génétique. Le « dogme » sous-entendait que l'information génétique est contenue dans l'ADN, que l'ARN n'a qu'un caractère transitoire de messenger et que les protéines sont les effecteurs permettant le bon fonctionnement de la cellule.

Cette façon de voir l'ARN comme un simple intermédiaire entre l'ADN et les ribosomes est désormais désuète. Par exemple, on sait maintenant que des molécules d'ARN, les ribozymes, peuvent effectuer des réactions enzymatiques (Kruger et al., 1982). Il est également intéressant de noter que l'association de molécules d'ARN et de protéines en complexes est essentielle pour un bon nombre de mécanismes cellulaires allant de la régulation de la traduction à l'élongation des télomères. C'est donc dire qu'une relation très étroite entre des facteurs protéiques et l'ARN est requise au sein de la cellule pour qu'elle atteigne son plein potentiel et qu'elle puisse assumer ses fonctions au sein de l'organisme. La découverte, l'étude et la caractérisation des facteurs cellulaires interagissant avec les molécules d'ARN nous permettent donc d'améliorer notre compréhension des mécanismes par lesquels la cellule arrive à gérer efficacement ses activités.

1.1.1. Objectifs de la thèse

Une panoplie de facteurs, régulant la traduction de populations spécifiques d'ARNs messagers grâce à divers mécanismes, existe au sein de la cellule eucaryote. Cette thèse présentera la somme des travaux effectués afin de valider l'hypothèse selon laquelle la protéine Stau1 humaine, une protéine liant l'ARN double-brin, est en mesure de stimuler la traduction de certains ARNs messagers cellulaires. Stau1 étant également en mesure d'interagir avec d'autres molécules de Stau1, la nature de ces interactions a également été investiguée.

1.1.2. Survol de l'introduction

Cette introduction a pour but de vous familiariser avec la littérature pertinente pour la mise en contexte des travaux qui furent conduits durant ces études doctorales. C'est ainsi que dans un premier temps, le transport et la traduction localisée de l'ARN vous seront présentés. En effet, l'implication de Stau1 dans ces phénomènes a été démontrée. S'en suivra une description succincte de la mécanistique de la traduction chez les eucaryotes et des mécanismes de régulation de la traduction par des structures d'ARN double-brin. La section suivante vous décrira en détail la protéine Stau1 ainsi que ses différentes fonctions cellulaires. Pour terminer, la dernière section traitera de l'importance de l'auto-association pour l'accomplissement des fonctions cellulaires de diverses protéines liant l'ARN.

1.2. Le transport et la traduction localisée des ARNs messagers

Plusieurs mécanismes de régulation post-transcriptionnelle sont essentiels à la cellule et sont utilisés à profusion par celle-ci (pour des revues, voir (Audic and Hartley, 2004; Sunnerhagen, 2007)). Ces mécanismes sont fréquemment coordonnés afin que les ARNm codant pour des protéines fonctionnellement proches soient régulés de façon similaire. C'est ce qui a mené aux concepts d'opérons ou des régulons post-transcriptionnels (Keene, 2007; Keene and Tenenbaum, 2002). Une telle organisation permet une réaction rapide aux différents stimuli. Effectivement, la transcription seule ne peut fournir cette flexibilité et cette rapidité de réponse à la cellule. La localisation de certains ARNs messagers à des endroits bien précis de la cellule couplée à leur traduction localisée est un des mécanismes importants de régulation post-transcriptionnelle (pour des revues voir (Corral-Debrinski, 2007; Du et al., 2007; Hoyle and Ashe, 2008; St Johnston, 2005)).

La localisation des ARNs messagers est de plus employée pour établir une dissémination asymétrique de l'information génétique. Ceci est crucial à plusieurs niveaux, que ce soit pour le développement d'un organisme, pour la différenciation cellulaire ou pour des fonctions cellulaires de base (pour une revue, voir (Kloc et al., 2002)). Les sections suivantes présentent un éventail de phénomènes pour lesquels la localisation d'ARN est

requis chez divers organismes ou modèles d'étude. Ces sections montreront également le lien étroit, parfois complexe et nécessaire entre la régulation traductionnelle des ARNs messagers et leurs mécanismes de transport et de localisation.

1.2.1. Le changement de type sexuel chez *S. cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* alterne entre des états diploïdes et haploïdes. Le retour à l'état diploïde se fait suite à la reproduction de deux cellules de type sexuel opposé; soit **a** ou **α**. La division se fait suite au bourgeonnement d'une cellule-fille à partir de la cellule-mère. La cellule-mère change toujours de type sexuel alors que la cellule fille conserve son type sexuel. Cette division a lieu de façon asymétrique afin d'éviter que les deux cellules issues de la division ne soient du même type sexuel. Ceci a pour but d'assurer qu'un spore isolé soit en mesure de générer des cellules diploïdes via reproduction entre ses descendants haploïdes (pour revues voir (Cosma, 2004; Darzacq et al., 2003)).

Le changement de type sexuel est effectué par l'endonucléase HO qui assure le réarrangement du locus MAT. Cette modification du locus permet de faire passer une cellule du type **a** au type **α** ou l'inverse. HO n'est présent que dans la cellule-mère puisque sa transcription est inhibée par le répresseur transcriptionnel Ash1p dans le noyau de la cellule-fille. La présence exclusive du facteur Ash1p dans la cellule-fille est obtenue grâce au transport actif et à la localisation du messager *ASH1* à la partie distale du bourgeon. C'est à cet endroit que l'ARNm *ASH1* sera ensuite traduit (pour revues voir (Muller et al., 2007; Paquin and Chartrand, 2008)).

1.2.1.1. Le « locasome » d'*ASH1*

Quatre tige-boucles, appelées éléments de localisation (E1, E2A, E2B et E3 respectivement), sont présentes dans le transcrit *ASH1* et sont importantes afin de localiser efficacement ce messager au bourgeon (Chartrand et al., 1999; Gonzalez et al., 1999). De plus, une série de facteurs protéiques sont requis pour la localisation efficace d'*ASH1* à la partie distale du bourgeon. L'ensemble de ces facteurs est appelé « locasome ». Le premier membre du locasome est She2p. She2p est une protéine liant l'ARN qui s'associe en homodimère aux éléments de localisation d'*ASH1* (Niessing et al., 2004), qui est localisée à la partie distale du bourgeon et qui est requise pour la localisation d'*ASH1* (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000). Second constituant du locasome, She3p est une protéine adaptatrice qui fait le lien entre la protéine liant l'ARNm *ASH1* (She2p) et le moteur moléculaire permettant le transport actif du complexe (Myo4p) (Takizawa and Vale, 2000). Dernier facteur du locasome, Myo4p est une myosine de type V qui permet les déplacements sur le cytosquelette d'actine et qui est requise pour le transport d'*ASH1* à la partie distale du bourgeon (Bobola et al., 1996; Haarer et al., 1994; Jansen et al., 1996).

1.2.1.2. L'importance de la traduction pour la localisation d'*ASH1*

Afin d'éviter que Ash1p ne soit présent dans la cellule-mère, *ASH1* est réprimé au niveau traductionnel tout au long de son transport et ce jusqu'à son ancrage dans le bourgeon. Le répresseur traductionnel Puf6p semble être un des facteurs requis pour la répression de la traduction d'*ASH1* au cours de son déplacement. En effet, dans une souche

délétée pour *PUF6*, la distribution asymétrique d'*ASH1* et d'Ash1p est compromise (Gu et al., 2004). Afin de médier la répression traductionnelle, Puf6p interagit avec le facteur de traduction Fun12p (l'homologue du facteur de traduction eIF5B chez les mammifères) pour empêcher la conversion du complexe 48S au complexe 80S lors de l'initiation de la traduction. La répression par Puf6p est inhibée suite à la phosphorylation de ce dernier par la protéine Casein Kinase II. De façon quelque peu similaire, la protéine Khd1p inhibe la traduction d'*ASH1* au niveau de l'initiation et est phosphorylé par Yck1p au niveau de la membrane plasmique du bourgeon, ce qui a pour effet de suspendre la répression traductionnelle médiée par Khd1p (Paquin et al., 2007).

Il est également important de noter que la traduction d'*ASH1* est importante pour sa localisation. En effet, en supprimant le codon initiateur d'*ASH1*, on diminue beaucoup sa capacité à s'ancrer à la partie distale du bourgeon (Gonzalez et al., 1999). Également, la délétion de certaines protéines ribosomiques conduit à une localisation imparfaite d'*ASH1* (Komili et al., 2007).

1.2.2. *oskar* dans l'ovocyte de *D. melanogaster*

Chez la mouche à fruit *Drosophila melanogaster*, une série de réorganisations de l'ovocyte dans l'ovaire ont lieu préalablement à la fertilisation (pour revue voir (Johnstone and Lasko, 2001)). L'ovocyte est entouré de 15 cellules-nourricières où seront transcrits une série d'ARN messagers qui seront transportés vers l'ovocyte pour une utilisation future. Ces ARNm sont ensuite distribués dans l'ovocyte en suivant un patron bien précis.

Les messagers *bicoid* et *oskar* sont localisés aux pôles antérieur et postérieur respectivement et servent à l'établissement de l'axe antéro-postérieur. *gurken*, pour sa part, de par sa localisation au coin antéro-dorsal sert à la détermination de l'axe dorso-ventral. *oskar* code pour une protéine essentielle à la formation des cellules polaires et des structures postérieures de l'organisme qui mèneront à la formation de la lignée germinale et de l'abdomen.

1.2.2.1. Les premiers pas : l'épissage et l'export vers le cytoplasme

La localisation d'*oskar* au pôle postérieur et sa dérégulation traductionnelle sont des mécanismes hautement complexes et régulés. Suite à sa transcription dans les cellules-nourricières, *oskar* sera épissé et des composants du complexe de jonction des exons (EJC) y seront déposés. Y14 et Mago nashi ont été identifiés comme composants de l'EJC présents sur *oskar* (Hachet and Ephrussi, 2001; Le Hir et al., 2001). Il est important de noter que malgré la présence de plusieurs introns, seul l'épissage du premier intron d'*oskar* et la présence des composants de l'EJC à cet endroit sont essentiels à sa localisation dans l'ovocyte (Hachet and Ephrussi, 2004). Il semblerait donc que la position de l'EJC joue un rôle dans le mécanisme de localisation d'*oskar*. Le messager sera ensuite exporté vers le cytoplasme, possiblement grâce à la protéine UAP56 (Meignin and Davis, 2008) ainsi que Bicaudal-D et Egalitarian (Clark et al., 2007).

1.2.2.2. L'importance du cytosquelette

Pour *oskar*, comme pour la majorité des ARNm localisés dans la cellule, le transport vers la destination se fait via le cytosquelette par l'intermédiaire d'un moteur moléculaire. C'est sur le réseau des microtubules (MT) qu'*oskar* est localisé grâce à la kinesin 1, un moteur moléculaire dirigé vers l'extrémité positive (+) des MT (Brendza et al., 2000; Clark et al., 1994). Plus précisément, ce sont les déplacements sur de longues distances qui sont effectués sur les MT. En effet, lorsqu'on injecte de l'ARN *oskar* loin du pôle postérieur, son déplacement dépend d'un réseau intact de MT. Par contre, si l'injection est faite de façon proximale au pôle postérieur le déplacement est indépendant du réseau de MT (Glotzer et al., 1997).

Il n'est donc pas surprenant que plusieurs facteurs influençant l'organisation, la réorganisation ou le maintien du réseau de microtubules de l'ovocyte aient été identifiés comme étant importants ou requis pour la bonne localisation du messager *oskar* au pôle postérieur. Parmi ces facteurs on retrouve notamment PKA, cornichon, gurken, torpedo, Squid, Rab11 et Par-1 (Dollar et al., 2002; Lane and Kalderon, 1994; Newmark and Boswell, 1994; Roth et al., 1995; Shulman et al., 2000; Steinhauer and Kalderon, 2005). Un récent rapport a démontré de façon élégante que les granules d'*oskar* ne se déplaçaient pas uniquement vers le pôle postérieur mais également vers le pôle antérieur. Par contre, ces granules ont une légère tendance à se diriger vers la partie postérieure de l'ovocyte. Également, ce groupe a confirmé que la kinesin 1 est requise pour le transport rapide du

messenger *oskar* vers l'extrémité (+) des MTs mais que la tendance à se diriger vers le pôle postérieur était due à un faible biais dans l'orientation des MTs (Zimyanin et al., 2008).

Il est à noter que seul quelques rapports font état d'une implication du réseau d'actine dans le transport et la localisation d'*oskar*. En effet, des mutations dans la Tropomyosin II, une protéine associée à l'actine dans les cellules non-musculaires, abolissent la localisation d'*oskar* (Erdelyi et al., 1995; Tetzlaff et al., 1996). Également, il a été montré que le réseau d'actine était nécessaire à l'association et au maintien d'*oskar* au pôle postérieur de l'ovocyte (Lantz et al., 1999).

1.2.2.3. Les facteurs importants pour la localisation d'*oskar*

À un certain moment, il était considéré que la région 3' non-traduite d'*oskar* était suffisante et nécessaire pour sa localisation au pôle postérieur. Il fut plus tard montré que ce n'était pas le cas mais que cette région était tout de même importante pour la localisation (Hachet and Ephrussi, 2004). C'est pourquoi beaucoup d'importance fut accordée aux facteurs liant cette région du transcrit. La protéine liant l'ARN double-brin Staufen est associée à *oskar* et est requise pour sa localisation via son second domaine de liaison à l'ARN double-brin (dsRBD) (Mickle et al., 2000). Barentsz est également associé spécifiquement aux complexes ribonucléoprotéiques (RNP) de localisation d'*oskar* (van Eeden et al., 2001). De plus, c'est grâce à ce dernier que le lien est fait entre l'EJC présent sur *oskar* et le RNP. En effet, Barentsz est en mesure de lier eIF4AIII qui interagit directement avec le complexe formé de Y14 et Mago nashi (Palacios et al., 2004).

Finalement, l'hnRNP Hrp48 s'associe avec les régions 5' et 3' non-traduite d'*oskar* et est également nécessaire à sa bonne localisation (Huynh et al., 2004; Yano et al., 2004).

1.2.2.4. Le contrôle traductionnel d'*oskar*

Il est à noter que la protéine Oskar n'est présente qu'au pôle postérieur et ce, uniquement lorsque le messenger *oskar* y a été localisé. On commence à connaître de mieux en mieux les mécanismes impliqués dans la répression et la dérégulation traductionnelle d'*oskar*. Le principal facteur permettant de réprimer la traduction d'*oskar* est Bruno. Identifié il y a plus de 10 ans, Bruno est une protéine liant l'ARN qui s'associe avec des éléments de réponse à Bruno (BREs) dans la région 3' non-traduite d'*oskar* (Kim-Ha et al., 1995). C'est cette liaison qui permet la répression de la traduction. Deux mécanismes pour expliquer ce phénomène ont été proposés jusqu'à maintenant.

Le premier implique la protéine Cup. Cup s'associe à Bruno et est en mesure de lier le facteur d'initiation de la traduction eIF4E grâce à un domaine conservé de liaison à ce dernier (Nakamura et al., 2004; Nelson et al., 2004; Wilhelm et al., 2003). Il a donc été proposé que Cup compétitionne avec eIF4G pour la liaison à eIF4E de façon similaire à la protéine Maskin chez *X. laevis*. Le recrutement de Cup sur *oskar* via Bruno permettrait donc d'inhiber la traduction en empêchant la liaison de la petite sous-unité ribosomique sur le messenger (Chekulaeva et al., 2006).

Le second mécanisme est efficace pour réprimer *oskar* même lorsque Cup n'est pas présent. En effet, en l'absence de Cup, le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome n'a pas lieu sur *oskar* (Chekulaeva et al., 2006). Cette répression est médiée par Bruno qui favorise l'oligomérisation des messagers jusqu'à la formation de larges particules silencieuses (50S-80S) inaccessibles aux ribosomes (Chekulaeva et al., 2006). Il semble donc qu'il y ait redondance afin d'assurer que la protéine Oskar ne soit présente qu'au pôle postérieur de l'ovocyte.

Outre Bruno et Cup, un autre couple de protéines ont été identifiées comme régulateur de la traduction d'*oskar*. En effet, Orb, un homologue de CPEB, est requis pour l'expression d'Oskar au pôle postérieur (Chang et al., 1999). En l'absence d'Orb, les ARNs *oskar* montrent des queues de poly-(A) de taille réduite. Il a ensuite été montré qu'Orb permet une polyadénylation cytoplasmiques des transcrits *oskar* (Castagnetti and Ephrussi, 2003). Un autre niveau de régulation s'ajoute puisqu'il a été proposé que le facteur Yps antagonise la fonction d'Orb en compétitionnant avec ce dernier (Mansfield et al., 2002). Jusqu'à maintenant, l'importance relative et la pertinence de la redondance des différents mécanismes de contrôle de la production d'Oskar n'ont pas encore été déterminées.

1.2.3. La mémoire chez les mammifères

La croissance persistante de la force synaptique suivant une stimulation à haute fréquence est appelée potentiation à long terme (LTP). La LTP est considérée comme un modèle neural intéressant en ce qui concerne l'étude de l'apprentissage et de la mémoire.

En effet, des manipulations génétiques ou pharmacologiques interférant avec la LTP affectent la mémoire et l'apprentissage (Pour revues voir (Abraham and Williams, 2008; Cooke and Bliss, 2006; Lynch, 2004; Matynia et al., 2002)). La LTP peut avoir lieu en deux phases, l'une précoce (E-LTP) qui est associée à la mémoire à court terme et une autre tardive (L-LTP) est associée à la mémoire à long terme.

1.2.3.1. L'importance de la traduction pour la mémoire à long terme

La présence de polyribosomes à la base des dendrites a été notée il y a déjà plusieurs années (Steward and Levy, 1982). Il ne restait qu'un pas à faire pour prédire l'importance de la traduction au niveau dendritique pour l'établissement de la mémoire (pour revue voir (Banko and Klann, 2008)). Au fil des ans il a été observé que la E-LTP s'opère via la modification de protéines déjà présentes à la synapse tandis que la L-LTP requiert l'expression génique et la synthèse de nouvelles protéines (Banko and Klann, 2008; Kandel, 2001). En effet, la E-LTP reste insensible à un traitement avec des inhibiteurs de traduction ou de transcription. Par contre, lorsque qu'on applique ces inhibiteurs, la L-LTP n'est plus présente et on observe plutôt un phénomène similaire à la E-LTP (Kelleher et al., 2004b). Il est à noter que le traitement avec un inhibiteur traductionnel n'a d'effet sur la L-LTP que s'il est fait avant ou au moment de son induction. Si on inhibe la traduction après l'induction de la L-LTP, aucun effet sur cette dernière n'est observé (Frey and Morris, 1997). Ceci suggère que l'augmentation des taux de traduction observée suite à la L-LTP (Kelleher et al., 2004a) n'est que transitoire. De façon

intéressante, la phase initiale de la L-LTP est indépendante de la transcription mais dépendante de la traduction alors que la phase subséquente est dépendante autant de la transcription que de la traduction (Kelleher et al., 2004a). Également, il a été montré que la traduction peut être observé dans des dendrites isolées du corps cellulaire suite à une stimulation induisant normalement la LTP (Job and Eberwine, 2001). Ces données mises ensembles viennent appuyer la thèse que la phase initiale de la L-LTP est médiée par la traduction d'ARN messagers déjà existant dans les dendrites et que la phase suivante est dépendante de transcrits nouvellement synthétisés qui sont transportés vers les dendrites pour y être traduits (Kelleher et al., 2004b).

1.2.3.2. Le transport des ARNs vers les dendrites

Plusieurs études ont été nécessaire à l'établissement d'un modèle permettant le transport et le ciblage d'ARNs particuliers vers les dendrites (pour revues voir (Sanchez-Carbente Mdel and Desgroseillers, 2008)). Les premières observations d'un déplacement d'ARNs dans les dendrites ont été faites grâce à des messagers radiomarqués au cours de leur transcription dans le noyau qui se retrouvaient après un certain temps dans les dendrites (Davis et al., 1987). Au cours des années, le mécanisme s'est précisé. En effet, il a été montré que le transport sur de longues distances des ARNs messagers se fait via le réseau de MT alors que la phase finale de la localisation requiert les filaments d'actine (Muslimov et al., 2002). Les granules d'ARN peuvent se déplacer tant du soma vers les dendrites que des dendrites vers le soma ce qui suggère qu'ils peuvent être transportés tant

par des dynéines que par des kinésines. En effet, il a été montré que lorsqu'on diminue l'expression de kinésine dans les neurones, il y a moins d'ARNs localisés dans les dendrites (Kanai et al., 2004). Cette étude a démontré également que si on sous-exprime certains constituants de granules associés à la kinésine 5, moins d'ARN peut être observé dans les dendrites.

Plusieurs ARNs possèdent, souvent dans leur région 3' UTR, un élément de ciblage aux dendrites ou DTE. Il a été montré que la suppression de cet élément abolissait la capacité de certains ARNs à être transportés efficacement vers les dendrites (Blichenberg et al., 1999; Mori et al., 2000). De plus, un lien entre la localisation dendritique de certains messagers et la mémoire a été établi. En effet, une souris mutante chez qui on a délété le DTE de la α CaMKII présente des problèmes de mémoire spatiale et de maintenance de la L-LTP (Miller et al., 2002). Également, si on empêche la liaison de facteurs en *trans* avec le DTE de la β -actine, le ciblage de ce messager aux cônes de croissance est abolit ainsi que la motilité de ces cônes (Zhang et al., 2001).

1.2.4. Un modèle général

Il existe plusieurs similitudes entre les différents modèles de localisation et de traduction localisée présentés précédemment. Les mécanismes généraux permettant de transporter un ARN messager à un endroit précis de la cellule ont été conservés au cours de l'évolution. En effet, on retrouve de nombreux points communs entre les mécanismes

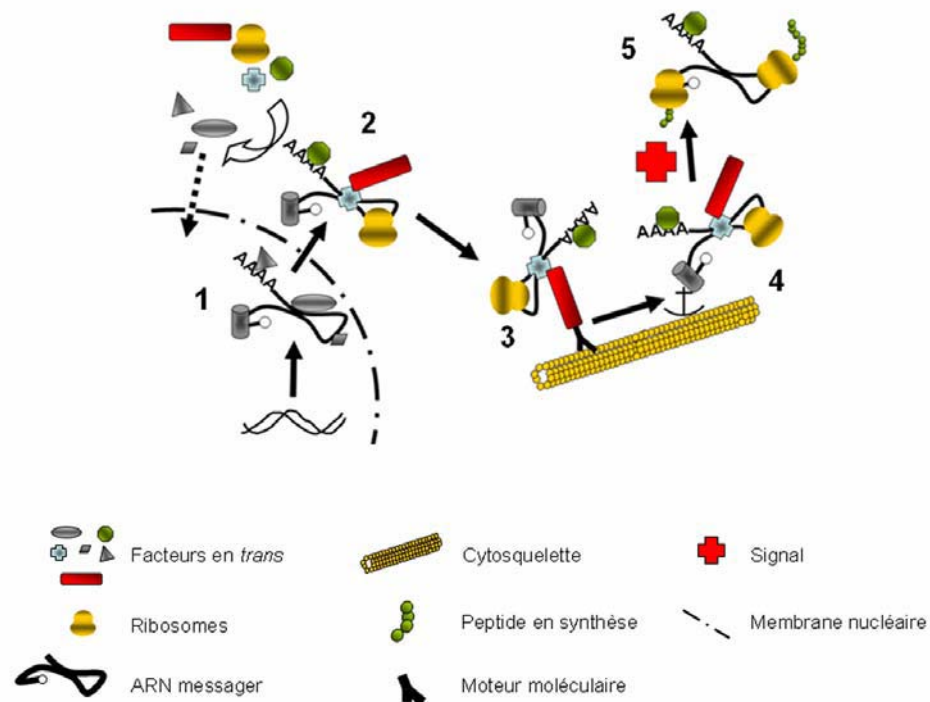


Figure 1 La localisation des ARNs messagers.

Le complexe ribonucléoprotéique se forme de façon co-transcriptionnelle par l'addition de facteur en *trans* (1). Ces facteurs permettront l'export du RNP vers le cytoplasme où une réorganisation aura lieu (2). Certains facteurs s'ajouteront et d'autres quitteront. Il sera alors possible au RNP de s'associer à un moteur moléculaire qui permettra son déplacement sur le cytosquelette (3). Une fois la destination atteinte (4), le RNP sera ancré en attente d'un signal qui lèvera la répression traductionnelle et permettra la synthèse protéique locale (5).

décrits chez la levure *S. cerevisiae*, la mouche *D. melanogaster* ainsi que chez les mammifères. La Figure 1 présente donc un modèle général des mécanismes de transport et de traduction localisée de l'ARN.

Dans un premier temps, le messenger est transcrit dans le noyau où il sera modifié (épissage, ajout de la coiffe, etc.) et reconnu par des protéines de liaison à l'ARN pour former un RNP. Suite à l'export vers le cytoplasme, le RNP est modifié par le retrait de certains facteurs et par l'ajout d'autres protéines, notamment les moteurs moléculaires, afin de former un RNP pouvant être localisé et réprimé au niveau de la traduction. Le RNP ainsi formé se déplacera ensuite sur le cytosquelette (que ce soit d'actine ou de tubuline) jusqu'à sa destination. Le complexe sera alors ancré et les transcrits pourront être traduits immédiatement ou attendre un signal leur permettant d'être déréprimés.

1.3. La traduction et certains de ses mécanismes de régulation

La traduction d'un ARN messenger en protéine chez les eucaryotes est un phénomène hautement complexe et régulé qui met en scène une quantité phénoménale de facteurs autres que ceux constituant le ribosome (pour revues voir (Dever, 2002; Kapp and Lorsch, 2004; Kozak, 2002; Sonenberg and Dever, 2003)). Dans cette section, la mécanistique générale de la traduction vous sera brièvement présentée ainsi que certains mécanismes de régulation jugés pertinents pour cette thèse.

1.3.1. L'initiation

L'objectif de l'initiation de la traduction est d'assembler au site d'initiation de la traduction sur l'ARN messager le ribosome avec l'ARN de transfert (ARNt) méthionyl initiateur lié au site P (pour revue voir (Algire and Lorsch, 2006)). La première étape de ce processus est l'assemblage du complexe ternaire (CT) (Figure 2). Pour ce faire, le facteur d'initiation de la traduction eIF2 complexé au GTP s'associera avec l'ARN de transfert méthionyl initiateur (Met-_iARNt). Le CT résultant, eIF2·GTP·Met-_iARNt, se lie à la sous-unité 40S du ribosome avec l'aide des facteurs eIF1, 1A et 3 pour former le complexe 43S.

De façon concomitante, le complexe nommé eIF4F lie la coiffe 7-methylguanosine située à l'extrémité 5' du messager. C'est eIF4F qui permettra ensuite le chargement du complexe 43S sur le messager avec l'assistance du facteur eIF3 et de la protéine de liaison au poly-A (PABP). Il est important de noter qu'eIF4F est composé des facteurs eIF4E, eIF4G et eIF4A. Chacun a un rôle important à jouer pour faciliter l'initiation de la traduction. C'est eIF4E qui fait contact direct avec la coiffe. eIF4G quant à lui est une protéine d'échafaudage qui fait le lien entre eIF4E et eIF4A. De plus, eIF4G permet l'interaction d'eIF4F avec PABP et eIF3. Pour sa part, eIF4A est une hélicase qui permet de défaire les structures double-brin pouvant être présentes dans la région 5'-UTR du messager.

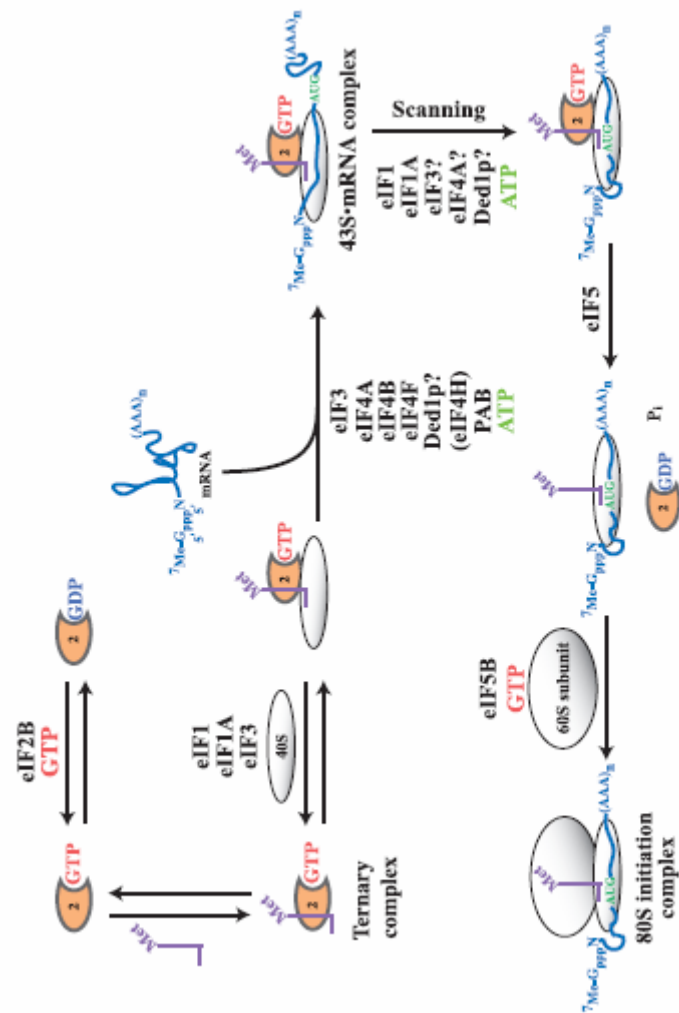


Figure 2 Les étapes de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes.

Tiré de (Kapp and Lorsch, 2004).

Une fois l'association faite entre le complexe 43S et le messager, le complexe 43S effectue un balayage de l'ARNm dans la direction 5' → 3' à la recherche du codon initiateur AUG lors d'un processus requérant de l'ATP. Afin d'être bien reconnu, l'AUG doit être dans le bon contexte Kozak, c'est-à-dire qu'on doit retrouver une purine en position -3 (par rapport au A de l'AUG) et un G en position +4. Une fois l'AUG sélectionné, eIF2 hydrolyse le GTP en GDP avec l'aide d'eIF5, ce qui permet à la traduction de débiter. eIF2·GDP se dissocie alors du complexe en laissant le Met-_iARNt dans le site P de la sous-unité 40S. Finalement, la sous-unité 60S, stimulée par eIF5B, se joindra au complexe déjà présent sur l'ARN afin de former le complexe d'initiation 80S en attente qu'un ARNt aminoacylé soit livré au site A afin de débiter l'élongation.

1.3.2. L'élongation

L'élongation débute avec un ARNt peptidyl dans le site P du ribosome. À ce moment, le site A est vacant. Un ARNt aminoacylé sera conduit au site A en complexe avec eEF1A·GTP. Ce complexe s'associera ensuite avec le site A du ribosome. L'appariement codon-anticodon causera ainsi le déplacement de trois bases de l'ARN ribosomique (ARNr) de la sous-unité 40S qui liera le complexe ARNm-ARNt. Cette liaison déclenchera l'activité GTPase d'eEF1A. eEF1A·GDP libérera à ce moment l'ARNt aminoacylé dans le site A (Figure 3A).

La catalyse de la formation du lien peptidique entre l'ARNt peptidyl et l'acide aminé nouvellement arrivé sera médiée par le centre peptidyl transférase du ribosome. Il en

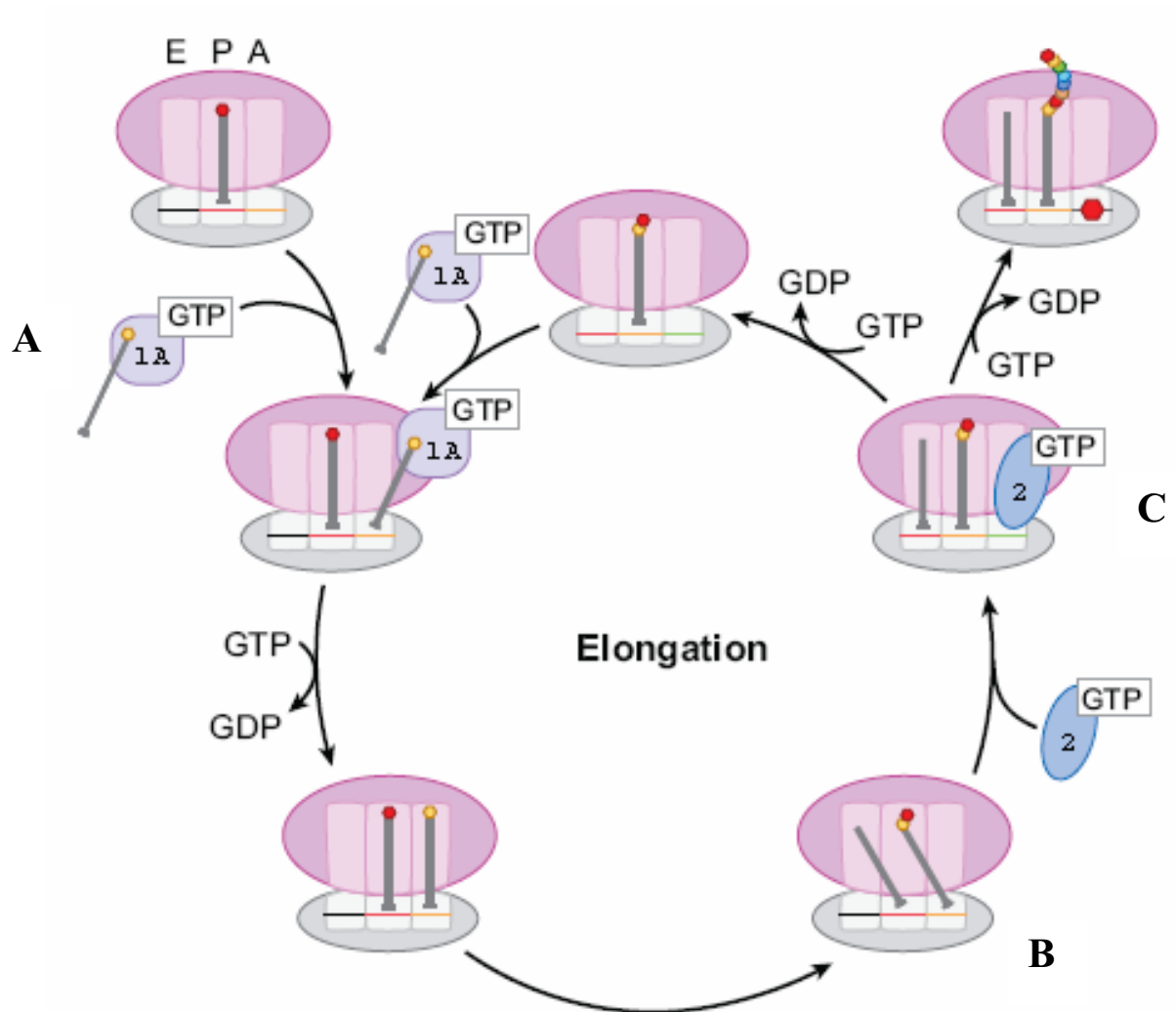


Figure 3 L'élongation de la traduction chez les eucaryotes.

Adapté de (Marshall et al., 2008).

résultera un ARNt sans acide aminé qui sera dans un état hybride entre le site P de la petite sous-unité et le site E de la grande sous-unité ribosomique, tandis que l'ARNt peptidyl sera dans un état hybride entre le site A de la petite sous-unité et le site P de la grande sous-unité (Figure 3B).

Il ne restera ensuite qu'à déplacer complètement l'ARNt déacylé dans le site E et l'ARNt peptidyl complètement dans le site P, tandis que l'ARNm se déplacera de trois nucléotides afin que le codon suivant se retrouve dans le site A. C'est le facteur eEF2 qui facilitera ce processus grâce à son activité GTPase (Figure 3C). Ce cycle se répétera jusqu'à ce qu'un codon stop se présente et que débute le mécanisme de terminaison de la traduction.

1.3.3. La terminaison

La terminaison de la traduction se produit lorsqu'un codon stop (UAA, UAG, UGA) se retrouve dans le site A du ribosome. S'en suivront une série d'événements qui mèneront à la relâche du polypeptide complété (Figure 4).

Dans un premier temps, le codon stop est identifié par un facteur de relâche de classe I. Chez les eucaryotes, un seul facteur est présent, il s'agit d'eRF1. En absence du ribosome, eRF1 est en complexe avec eRF3, le seul facteur de relâche de classe II chez les eucaryotes. Ainsi, le complexe eRF1·eRF3·GTP se liera au site A du ribosome (Figure 4A). Suite à cette liaison un réarrangement similaire à la translocation se produit et le complexe

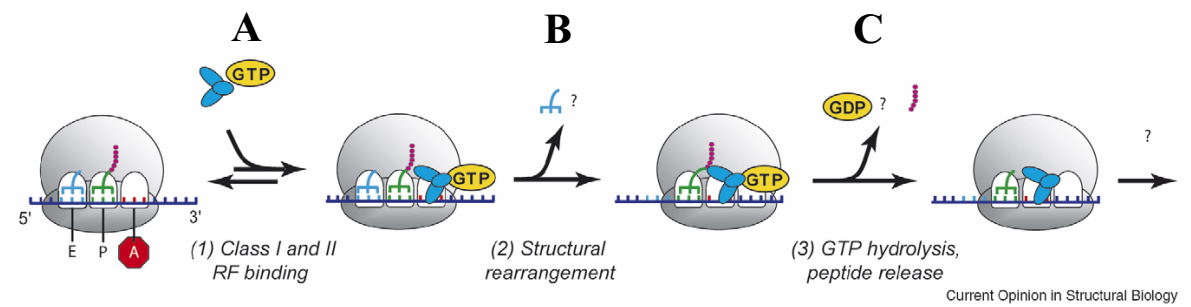


Figure 4 La terminaison de la traduction chez les eucaryotes.

Adapté de (Petry et al., 2008).

de relâche se trouve au site P tandis que l'ARNt peptidyl est dans un état hybride entre le site P et le site E (Figure 4B). L'activité GTPase d'eRF3 permettra l'hydrolyse du GTP en GDP, ce qui favorise la relâche du peptide grâce à l'hydrolyse de l'ARNt peptidyl par eRF1 et le centre peptidyl transferase du ribosome (Figure 4C). Jusqu'à maintenant, la façon et le moment où le complexe de relâche se dissocie du ribosome ne sont pas connus. Suite à sa relâche, le peptide est libre de mener à bien ses fonctions au sein de la cellule tandis que le ribosome sera recyclé afin de procéder à la synthèse d'autres protéines cellulaires.

1.3.4. La régulation de la traduction par des structures d'ARN

Tel que montré précédemment, la traduction est un mécanisme très complexe qui peut être régulé à une multitude de niveaux. La présence de structures complexes d'ARN dans le messager permet notamment de réguler l'initiation de la traduction (pour revues voir (Kapp and Lorsch, 2004; Kozak, 2004, 2005)). Par exemple, il a été remarqué que le fait de positionner des tige-boucles d'ARN près de la coiffe diminuait la traduction d'un ARN et que plus la structure placée était stable, moins la traduction était efficace (Vega Laso et al., 1993). Il fut donc proposé que la présence de structures secondaires d'ARN à proximité de la coiffe diminue l'accessibilité de celle-ci pour eIF4E, réduisant du fait même l'efficacité de l'initiation de la traduction. Par contre, il semblerait que dans certains cas, la présence d'une structure double-brin à proximité de la coiffe n'interfère pas avec la liaison par eIF4E (Muckenthaler et al., 1998). Dans ces cas, la diminution d'efficacité

traductionnelle résulterait de l'incapacité d'eIF4E à interagir avec ses partenaires habituels, ce qui serait causé par l'obstruction due aux structures secondaires d'ARN.

De façon intéressante, la présence de tige-boucles à proximité du codon initiateur AUG peut également influencer l'efficacité traductionnelle d'un ARNm. Par exemple, un codon AUG ne possédant pas de contexte Kozak parfait n'est pas très efficace pour initier la traduction par rapport à un autre avec le bon contexte (Kozak, 1997). Par contre, si on positionne une tige-boucle d'ARN en aval de cet AUG non optimal, l'efficacité de ce codon initiateur est augmentée. Il a été proposé que le fait de ralentir le balayage du ribosome lorsque l'AUG est positionné dans le centre de reconnaissance de l'AUG améliore l'efficacité de celui-ci (Kozak, 2005).

Outre les structures d'ARN double-brin elles-mêmes, des facteurs en *trans* s'associant à celles-ci peuvent influencer l'efficacité traductionnelle d'un ARN messager. Par exemple une protéine ARN hélicase pourra délier une structure double-brin à proximité de la coiffe pour faciliter l'initiation de la traduction. Également, une protéine s'associant à une structure d'ARN peut aider au recrutement d'un facteur d'initiation de la traduction et ainsi aider au lancement de celle-ci. Des exemples de régulation traductionnelle via une protéine s'associant à des structures d'ARN dans les régions 5'UTR ou 3'UTR vous seront présentés.

1.3.4.1. Les protéines de régulation du fer et les éléments de réponse au fer

Les éléments de réponse au fer ou Iron Responsive Elements (IRE) sont des structures d'ARN double-brin d'environ 30 nucléotides qui sont très conservées phylogénétiquement (pour revues voir (Leipuviene and Theil, 2007; Pantopoulos, 2004)). La structure des IRE est une hélice de 9 ou 10 paires de bases (pb) avec une hexaboucle terminale et un résidu non-pairé dans la tige qui crée une tige supérieure de 5 pb ainsi qu'une tige inférieure de taille variable (Figure 5A). Le messenger de la Ferritin possède un IRE dans sa région 5'UTR à proximité de la coiffe. La traduction de cet ARNm est gouvernée par cet élément et est le modèle le mieux étudié de la régulation traductionnelle par un IRE.

La Ferritin est une protéine centrale du mécanisme de régulation de l'homéostasie du fer chez les mammifères (pour revue voir (Rouault, 2006)). Cette protéine a pour fonction de séquestrer le fer lorsqu'il y a excès au niveau intracellulaire. Ceci a pour but d'empêcher la formation de radicaux d'oxygène et d'azote pouvant être dangereux pour le matériel génétique contenu dans le noyau. C'est donc dire que les niveaux de Ferritin doivent être finement régulés afin que le fer soit disponible lorsque l'organisme le requiert.

Cette régulation au niveau de la traduction est dépendante des quantités de fer présentes dans la cellule. Lorsque les niveaux de fer sont bas, les IRPs sont en mesure de lier les IREs dont celui présent en 5'UTR du messenger de la Ferritin (Figure 5B). En effet, en absence de liaison au fer, les IRPs adoptent une conformation leur permettant de lier l'ARN (Haile et al., 1992). Cette liaison au 5'UTR du messenger inhibe la traduction en

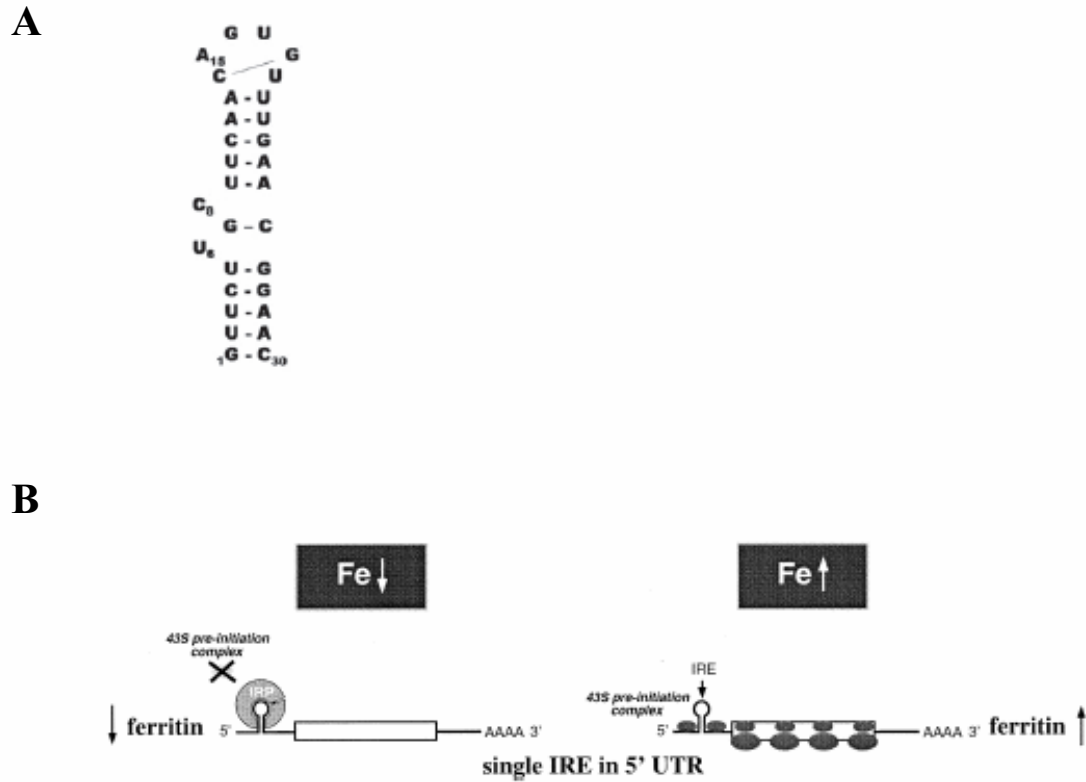


Figure 5 Structure de l'IRE et régulation traductionnelle de la Ferritin.

(A) Structure secondaire de l'IRE (Tiré de (Leipuviene and Theil, 2007)). (B) Schéma de la régulation de la traduction du messenger de la Ferritin par l'IRP (Adapté de (Pantopoulos, 2004)).

empêchant le recrutement du complexe 43S sur l'ARN malgré la présence d'eIF4F sur la coiffe (Muckenthaler et al., 1998). Ceci a pour effet de diminuer les niveaux de Ferritin, ce qui augmente la disponibilité du fer. Par contre, lorsque le fer est en excès, les IRPs associées à ce métal ne seront plus en mesure de lier les IREs. C'est ainsi que la traduction du transcrit Ferritin pourra avoir lieu de façon normale afin de stabiliser les quantités de fer cytosoliques (Figure 5B).

Outre dans le messager de la Ferritin, on a identifié des IREs dans les ARNm de plusieurs autres protéines impliquées dans le métabolisme du fer chez les mammifères. Certains IREs se trouvent dans les régions 5'UTR des messagers tandis que d'autres sont présents dans les 3'UTR où il sont responsables du contrôle de la stabilité des ARNs (Leipuviene and Theil, 2007).

1.3.4.2. La traduction des histones

Les ARNm des histones dépendantes de la réplication chez les métazoaires diffèrent des autres messagers eucaryotes en ce qu'ils ne sont pas polyadénylés. Ces ARNs se terminent plutôt par une séquence conservée de 26 nucléotides comprenant une tige-boucle (pour revue voir (Jaeger et al., 2005)). Cette tige-boucle terminale est liée par la protéine de liaison à la tige-boucle (SLBP) qui est requises pour la maturation du pre-ARNm dans le noyau ainsi que pour la traduction du messager dans le cytoplasme.

Dans un premier temps il fut montré que SLBP pouvait stimuler la traduction des messagers des histones mais également celle de rapporteurs portant la tige-boucle terminale en 3'UTR (Gallie et al., 1996; Sanchez and Marzluff, 2002). Puis il fut remarqué que SLBP était associé avec les polysomes mais que cette interaction était dépendante de la présence du messenger des histones (Whitfield et al., 2004). Le mécanisme permettant une stimulation traductionnelle par une protéine liant une structure d'ARN double-brin dans le 3'UTR d'un ARN messenger fut ensuite élucidé.

Deux groupes ont publié que SLBP interagissait avec des facteurs d'initiation de la traduction afin de stimuler la traduction des messagers des histones. La première équipe a montré chez la levure *S. cerevisiae* que les facteurs eIF4E, eIF4G et eIF3 étaient requis pour la stimulation traductionnelle par SLBP et que SLBP et eIF4G peuvent s'associer (Ling et al., 2002). Le second groupe a montré chez *X. laevis* que SLBP interagit avec eIF3 et que eIF4E est requis pour la traduction des ARNm des histones (Gorgoni et al., 2005). Ils ont également montré que SLBP ne peut stimuler la traduction indépendante de la coiffe médiée par des IRES. Ces résultats ont menés à l'élaboration d'un modèle où SLBP permettrait la circularisation de l'ARN en s'associant à des facteurs d'initiation de la traduction présents en 5' du messenger. Ceci aiderait au recrutement de la sous-unité 40S du ribosome et donc à l'initiation de la traduction des messagers des histones.

1.4. La protéine Staufen

La protéine Staufen est présente chez les métazoaires et fut identifiée initialement chez la mouche à fruit *D. melanogaster* (St Johnston et al., 1991). À ce moment, il était déjà connu que le gène *staufer* était requis pour l'établissement des extrémités tant antérieures que postérieures chez la mouche (Schupbach and Wieschaus, 1986). Au fil des ans, les domaines composant la protéine furent identifiés tout comme les gènes présents chez les mammifères. Staufen est maintenant bien connu et étudié pour son rôle dans la localisation des ARNm tant chez la drosophile que dans le système nerveux des mammifères ainsi que pour son importance dans la réplication du virus HIV-1 (Chatel-Chaix et al., 2007; Chatel-Chaix et al., 2008; Chatel-Chaix et al., 2004). Cette section vous présentera donc l'organisation de la protéine Staufen, ses partenaires cellulaires et ainsi que ses rôles connus.

1.4.1. Description de la protéine Staufen

Le clonage de Staufen chez la drosophile mena directement à l'identification d'un domaine protéique dont la séquence était jusque là inconnue et dont on devinait l'existence à cause de la capacité de certaines protéines à lier spécifiquement l'ARN double-brin. Staufen contient en effet plusieurs copies du domaine de liaison à l'ARN double-brin (dsRBD), domaine conservé que l'on retrouve dans plusieurs protéines chez différents organismes allant de la bactérie aux mammifères (St Johnston et al., 1992).

1.4.1.1. Le domaine de liaison à l'ARN double-brin

On retrouve le dsRBD chez plusieurs organismes dans des protéines aux fonctions variées (Tableau I). Le dsRBD est un domaine d'environ 65-68 acides aminés qui reconnaît spécifiquement les structures d'ARN double-brin tout en étant incapable de lier l'ARN simple-brin ou l'ADN, qu'il soit double-brin ou simple-brin. De plus, lors d'essais *in vitro* de liaison à l'ARN, il fut remarqué que les dsRBDs lient l'ARN double-brin en absence de spécificité pour la séquence, ce qui fut confirmé par des études de structures. En effet, il a été montré que les dsRBDs interagissent avec le squelette sucre-phosphate du duplex d'ARN et ce sans contact direct avec les bases azotées (Ryter and Schultz, 1998). Il a donc été proposé que la sélectivité des substrats d'ARN pourrait être dépendante des partenaires protéiques des facteurs contenant des dsRBDs. Le dsRBD se replie en une structure compacte α - β - β - β - α , où les hélices α reposent sur la face d'un feuillet β antiparallèle, et fait contact en trois endroits avec le duplex d'ARN (Figure 6) (Kharrat et al., 1995). Il a été déterminé qu'un duplex d'ARN de 11 à 16 pb équivaut à la longueur d'un seul dsRBD (Manche et al., 1992). À ce jour, deux types de dsRBD ont été recensés. Les dsRBDs de type A ont une grande homologie sur toute leur longueur avec la séquence consensus admise. Par contre, les dsRBDs de type B ne sont conservés avec le consensus que dans leur portion C-terminale. Les domaines de type B ne lient habituellement pas efficacement l'ARN double-brin et il fut proposé qu'il était plutôt utiles pour stabiliser la liaison à l'ARN ou aux partenaires protéiques (Doyle and Jantsch, 2003).

DRBP	Alternative names	Species	Accession number	MW (kD)	Cellular localization	Cellular role
PKR	p68/DAI	Human	AAA35409	68	Cytoplasm ~20% nuclear	Anti-viral defense Cellular stress response
		Rat	AAA01925			
TRBP	TIK/p65	Mouse	Q09983	66	Both	Translation activation
		Human	AAA35765	40-50		
PACT	PRBP	Mouse	P97473	35	Cytoplasm	Activates PKR in response to stress
		Human	AAC25672			
	RAX	Mouse	AAD33098	33		
	Xlrpba	<i>Xenopus</i>	AAA40947			
Staufen	CG6896	<i>Drosophila</i>	NP_609646		Cytoplasm nucleus? (NLS)	Localization and translation activation of mRNAs
		Human	AAD17531	60, 65		
		Rat	AAF98119			
		Mouse	AAD17529			
NEAR1	DRBP76	<i>Drosophila</i>	P25159	90	Nuclear	mRNA processing; interacts with PKR; transcription
		Human	AF167569	110		
NEAR2		Rat	AF167570			
		Mouse	AAAF31446			
	ILF3	<i>Xenopus</i>	AAAC71052			
		Human	AAAI9960			
	4F.1	<i>Xenopus</i>	AAAI9961			
		Human	AAAG22859			
	CBTF ¹²²	Human	AAK20832	74	Nuclear?	mRNA transportation; interacts with PKR
		Rat	AAF59924			
SPNR	p74	Mouse	A57284	71	Cytoplasm	
		Human	CAA71668			
RHA	MLE	Mouse	AAAC05725	130	Nuclear	Helicase activity; interacts with RNA pol II-role in mRNA processing
		<i>Drosophila</i>	AAF57297			
NREBP	SON; DBP5	Human	AAK07692	257	Nuclear	Cellular role unknown; binds NRE of HBV to repress viral transcription and virion production
		Mouse	AAF23120			
		<i>Drosophila</i>	AAF54409			
		<i>C. elegans</i>	T38856			
Kandaptin		Human	AAK29177		Nuclear	
		Mouse (partial)	AAB88191			
		<i>Drosophila</i>	AAF55582			
		<i>C. elegans</i>	NP_499172			
		<i>A. thaliana</i>	NP_198700			
		(plant)	BAB19354			
HYL1	F21M12	<i>O. sativa</i> (rice)	NP_563850		Nuclear	Hormone signaling important for plant growth and development
		<i>A. thaliana</i>	NP_563850			
Hypostatic leaves	RBP2	<i>B. oleracea</i> (cabbage)	CAC05659			
		<i>O. sativa</i>	BAB00641			
ADAR1	DRADA1	Human	AAB97118	150/110	Nuclear	A to I mRNA editing of viral and brain mRNAs as well as unidentified targets in the liver
		Rat	P56266	130		
	dsRAD-1	Mouse	AAK16102		150 kDa IFN-inducible form also cytoplasmic	
		<i>Xenopus</i>	AAB51687	120		
		<i>C. elegans</i>	AF051275			
		Human	P78563	90		
ADAR2	RED1	Rat	P51400		Nuclear	A-to-I mRNA editing of Q/R site in GluR
		Mouse	AAK17102			
	DRADA2	<i>Drosophila</i>	AAF53702	80		
		Human	AAF78094			
ADAR3	RED2	Rat	AAB41862	81		Brain-specific No adenosine deaminase activity detected
		Mouse	AAF76894			
TENR		Human	XP_0509592		Nuclear	Testis-specific posttranscriptional mRNA processing
		Mouse	CAA59168	72		
RNaseIII	Drosha	Human	AAF80658	160	Nuclear	Endoribonuclease activity cleaves dsRNA
		<i>Drosophila</i>	AAF59169	~153		
		<i>C. elegans</i>	Z81070			Processing of pre-rRNA
		<i>S. cerevisiae/pombe</i>	Q52555/S56784	50		
	RNT/PAC	<i>E. coli</i>	P36797	26		
		Human	BAA78691	220		
Dicer	Helicase MOI	Mouse	AF408401	215	Cytoplasmic multiple NLS?	Helicase and endoribonuclease activity Role in RNAi
		<i>Drosophila</i>	AAF56056	210		
		<i>C. elegans</i>	S44849			
		<i>A. thaliana</i>	AAF03534			
RDE-4		<i>S. pombe</i>	Q00884			Deliver dsRNAs to Dicer to activate RNAi
		<i>C. elegans</i>	AY071925			

Tableau I Protéines portant des domaines de liaison à l'ARN double-brin.

Adapté de (Saunders and Barber, 2003)

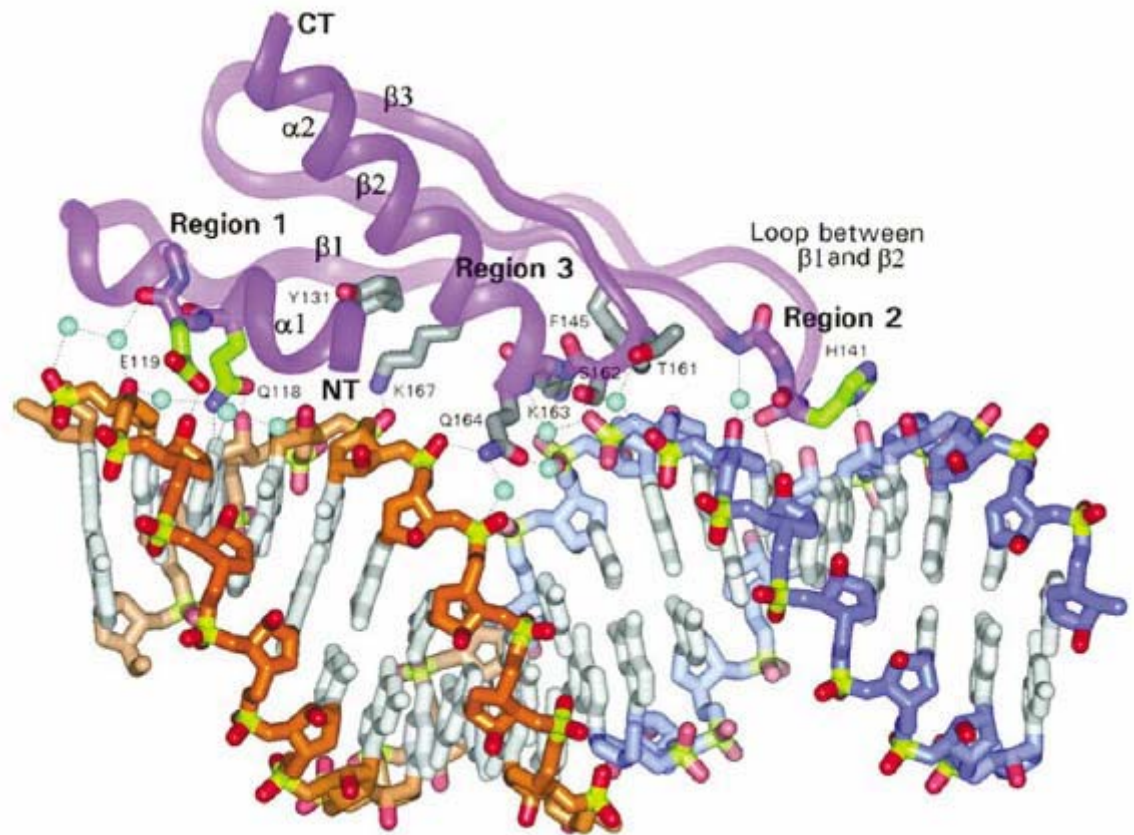


Figure 6 Structure du dsRBD2 de Xlrpba en complexe avec l'ARN double-brin.

Le dsRBD (violet) fait contact en trois points (régions 1, 2 et 3) avec la structure d'ARN double-brin (rouge et bleu). Tiré de (Doyle and Jantsch, 2003).

1.4.1.2. Organisation protéique de Staufen

Chez la drosophile, Staufen possède cinq dsRBDs (numérotés de 1 à 5), trois de pleine longueur de type A et deux demi domaines de type B (Figure 7). La liaison à l'ARN par la protéine est médiée principalement par le dsRBD3. Chez les mammifères, un premier gène Staufen fut identifié et appelé Stau1 (DesGroseillers and Lemieux, 1996; Marion et al., 1999; Wickham et al., 1999). Il fut alors constaté que Stau1 ne possède que quatre des cinq dsRBDs que l'on retrouve chez *D. melanogaster*. De plus, un domaine de liaison à la Tubuline (TBD) est présent chez les mammifères, mais pas chez la mouche à fruits. De façon intéressante, c'est également via le dsRBD3 que la liaison à l'ARN double-brin se fait chez les mammifères. Trois isoformes sont connus jusqu'à maintenant, un de 63 kDa (Stau1⁶³), un de 55 kDa (Stau1⁵⁵) et Stau1ⁱ (Figure 7). La protéine Stau1ⁱ possède une insertion de six acides aminés dans le dsRBD3, ce qui abolit sa capacité à lier l'ARN (Duchaine et al., 2000; Monshausen et al., 2001).

Un second gène Staufen fut plus tard identifié chez les mammifères et nommé Stau2 (Duchaine et al., 2002). La protéine Stau2 contient un TBD tout comme Stau1, mais par contre, certains de ses isoformes possèdent un dsRBD supplémentaire complet correspondant au dsRBD1 de la protéine de drosophile (Figure 7). De façon intéressante, Stau2 ne possède qu'une version tronquée du dsRBD5 présent chez Stau1. C'est encore une fois grâce à son dsRBD3 que cette protéine peut lier l'ARN double-brin. Il est à noter que Stau1 et Stau2 ne se retrouvent pas dans les mêmes RNPs dans les neurites

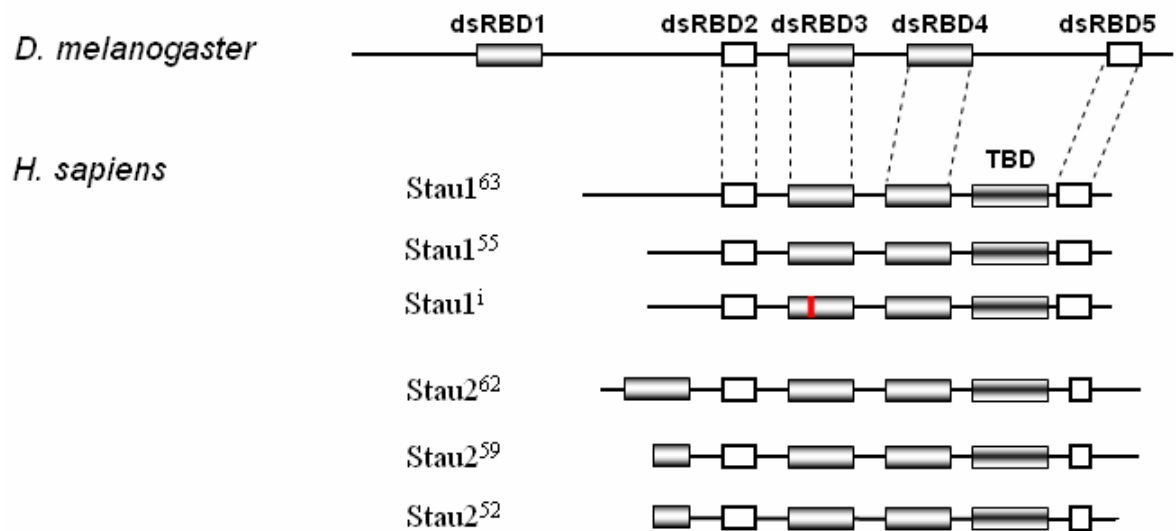


Figure 7 Représentation schématique des protéines Staufen.

La position et le numéro des dsRBDs sont inscrits ainsi que la position du domaine de liaison à la Tubuline (TBD). Les dsRBDs de type A sont en gris et les dsRBDs de types B sont en blanc. La correspondance entre les domaines de la protéine de la mouche à fruit et ceux des protéines humains est indiquée par les traits hachurés. Le trait rouge indique l'insertion de 6 acides aminés dans les dsRBD3 de l'isoforme Stau1ⁱ.

(Duchaine et al., 2002). La suite de cette thèse traitera exclusivement de Stau1 puisque c'est sur cette protéine que la présente étude porte.

1.4.1.3. La distribution intracellulaire de Stau1

Ubiquiste, Stau1 est présent dans une grande diversité de types cellulaires. Dans des cellules non polarisées, Stau1 a une distribution principalement cytoplasmique avec un faible marquage nucléaire. Stau1 est associé au cytosquelette ainsi qu'à des structures vésiculaires et est localisé au réticulum endoplasmique rugueux (Wickham et al., 1999). Dans les neurones, des cellules polarisées, Stau1 a une distribution somatodendritique et est exclu des axones (Kiebler et al., 1999). Dans les dendrites, Stau1 est trouvé à proximité des synapses et est associé aux microtubules. Le long des dendrites, on retrouve Stau1 sous forme de granules ou de particules motiles colocalisant avec l'ARN (Mallardo et al., 2003). Également, Stau1 s'accumule dans le sarcoplasme post-synaptique des fibres musculaires à la jonction neuromusculaire (Belanger et al., 2003).

Tel que dit précédemment, Stau1 présente un faible marquage nucléaire lorsqu'on observe sa distribution au microscope. Une étude récente a montré que Stau1 possédait un signal de localisation nucléaire (NLS) fonctionnel en deux portions à la fin de son dsRBD3 (Martel et al., 2006). Ce NLS est requis pour la présence de Stau1 dans le noyau mais également dans le nucléole. Le dsRBD3 de Stau1 est essentiel pour le maintien de la protéine dans le cytoplasme, mais également pour son trafic nucléolaire.

1.4.2. Les partenaires protéiques de Stau1

Suite à l'identification et à la caractérisation de Stau1 chez les mammifères, une série d'études ont montré l'interaction de Stau1 avec divers facteurs protéiques ainsi que la composition des RNPs de Stau1. Dans un contexte neuronal, il fut d'abord montré par microscopie électronique que Stau1 était présent dans de larges granules enrichis en ribosomes et contenant de l'ARN (Krichevsky and Kosik, 2001), qu'il interagissait directement avec la protéine phosphatase 1 (PP1) (Monshausen et al., 2002) et que Stau1 faisait partie de complexes comprenant notamment Pur α , FMRP et myosin Va (Ohashi et al., 2002). Plus récemment, Staufen1 fut identifié en tant que constituant des RNPs de la kinésine conventionnelle (KIF5) dans le cerveau de la souris (Kanai et al., 2004) et ce, en compagnie de FMRP et Pur α . C'est donc dire que Stau1 est présent dans des complexes où l'on retrouve tous les constituants d'un RNP impliqué dans le transport et la traduction localisée de l'ARN. C'est-à-dire, de l'ARN, des ribosomes, des protéines impliquées dans la régulation traductionnelle et des moteurs moléculaires.

Au même moment, une étude a présenté des résultats précisant la nature de l'interaction entre Stau1 et les ribosomes. En effet, bien qu'il fût connu que Stau1 cofractionnait avec les ribosomes dans un gradient de sucrose, les domaines en jeu n'avaient pas encore été identifiés. C'est ainsi qu'a été montrée la capacité de Stau1 à cofractionner avec les deux sous-unités ribosomiques (Luo et al., 2002). De plus, l'interaction de Stau1 avec le ribosome peut se faire en partie de façon indépendante de sa

capacité à lier l'ARN. Le domaine minimal permettant l'interaction indépendante de l'ARN fut identifié comme la portion comprenant le dsRBD4 et le TBD de Stau1.

Des études de protéomique sur les RNPs contenant Stau1 furent également conduites. En effet, deux articles similaires, publiés à seulement quelques mois d'intervalle, arrivent pratiquement aux mêmes résultats en ce qui concerne les protéines présentes dans les complexes cellulaires où Stau1 est présent (Brendel et al., 2004; Villace et al., 2004). Les protéines identifiées sont présentées au Tableau II. Afin d'arriver à ces résultats, les deux groupes ont employé la technique de purification par affinité en tandem (TAP-tagging) de Stau1 à partir de cellules HEK 293 suivie de l'identification des constituants par spectrométrie de masse. Il en ressort que ces RNPs contiennent des ribosomes, des éléments du cytosquelette, des moteurs moléculaires et des protéines pouvant réguler la traduction de certains messagers.

Il faut également noter l'identification des protéines Barentsz (Macchi et al., 2003) et Upf1 (Kim et al., 2005) comme partenaires de Stau1. En effet, ces deux constituants essentiels de la voie de dégradation des ARNm portant des codon non-sens, le nonsense-mediated decay (NMD), interagissent directement (UPf1) et de façon ARN dépendante (Barentsz) avec Stau1.

Protein	Accession no.	Identification technique Mass spectrometry	Western blot	Confocal immunofluorescence
β -5 Tubulin	gil18088719	+ (187 ^a)	+	+
α -Tubulin		—	+	+
Tau		—	+	+
hStaufen isoform 2	gil10944134	+ (273)	+	+
β -Actin		—	+	+
Myosin heavy chain	gil7669506	+ (103)	NT	NT
RNA-dependent RNA helicase A	gil3915658	+ (139)	+	+
Nucleolin	gil21750187	+ (86)	+	+
hnRNP U (SAF A)	gil14044052	+ (91)	—	—
Poly(A)-binding protein	gil4505575	+ (107)	+	+
α -Internexin (neuronal intermediate filament)	gil14249342	+ (77)	+	+
Dynein intermediate chain	—	+	+	+
Kinesin		—	+	+
p-Associated protein kinase II	gil4759044	+ (74)	NT	NT
Ras GAP	gil627594	+ (74)	NT	NT
Rac1		—	+	+
Cdc42		—	+	+
IQGAP1 protein	gil4506787	+ (87)	+	+
FMRP		—	+	+
Ribosomal protein P0	gil12654583	+ (120)	NT	NT
Ribosomal protein S4 ^b	gil539681	+ (150)	NT	NT
Ribosomal protein S6	gil20381196	+ (120)	+	+
Ribosomal protein L6 ^b	gil18088374	+ (103)	NT	NT
Ribosomal protein L28	gil13904866	+ (116)	+	+

^aIdentification score (see Materials and Methods).

^bMany other small and large ribosomal proteins were identified that are not included in this table (data not shown).

Tableau II Protéines associées avec les complexes contenant Stau1.

Tiré de (Villace et al., 2004).

1.4.3. Les rôles cellulaires connus de Staufén

C'est donc dire que l'identification des partenaires protéiques de Stau1 a suggéré l'implication de cette protéine dans une multitude de phénomènes cellulaires comme la traduction, le transport de l'ARN et la régulation de la stabilité des ARNs. La présente section vous présentera donc les phénomènes pour lesquels Staufén est requis tant chez les mammifères que chez la drosophile.

1.4.3.1. La localisation d'ARN messagers

Tant chez les mammifères que chez *D. melanogaster*, il a été montré que Staufén était important pour la localisation d'ARNs messagers particuliers vers des endroits précis de la cellule. Chez la mouche à fruit, Staufén est requis dans l'ovocyte afin que l'établissement de l'axe antéro-postérieur se déroule correctement. Il a été démontré que la localisation des transcrits *bicoid* et *oskar* aux pôles antérieur et postérieur, respectivement, est dépendante de Staufén (Figure 8A-F). En effet, dans une lignée nulle pour Staufén, *oskar* (Figure 8C) et *bicoid* (Figure 8F) ne sont pas localisés correctement. Dans le cas de *bicoid*, Staufén s'associe à des structures complexes présentes dans le 3'UTR du messenger (Ferrandon et al., 1994). Le 3'UTR de *bicoid* est en mesure d'homodimériser, ce qui est nécessaire au recrutement de Staufén et donc à la localisation antérieure de ce messenger (Ferrandon et al., 1997). En ce qui concerne *oskar*, Staufén en permet la localisation au pôle postérieur grâce à son dsRBD2 (Micklem et al., 2000). Bien qu'*oskar* soit également

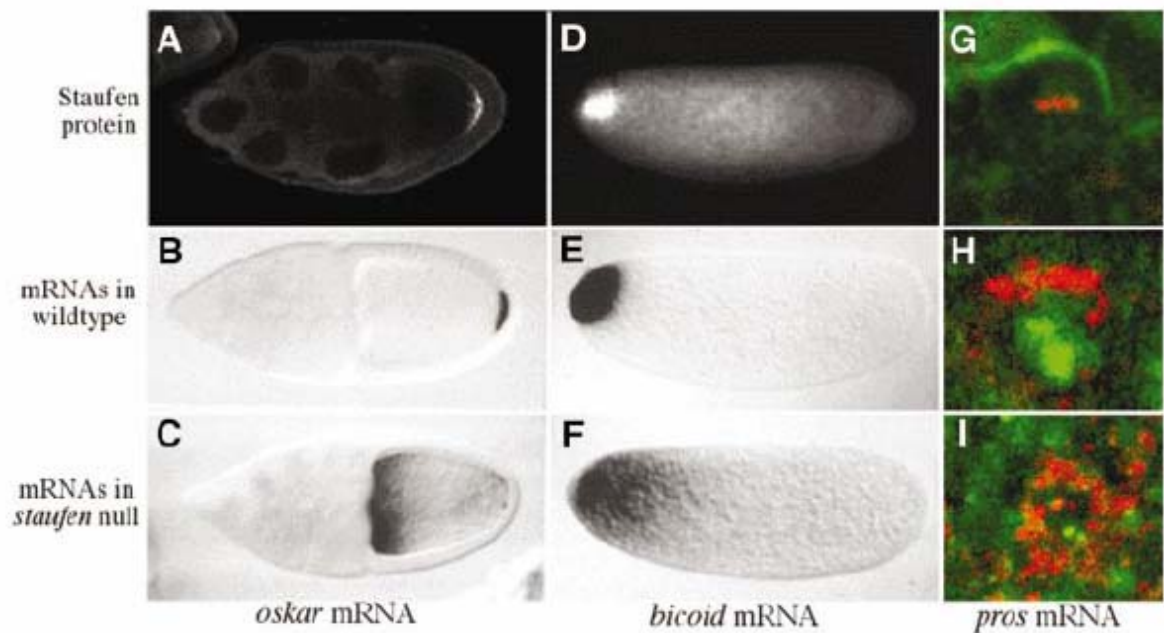


Figure 8 Localisation des messagers *oskar*, *bicoid* et *prospero* chez la drosophile.

(A) Localisation de la protéine Staufen au stade 9 du développement de l'ovocyte. (B) Localisation d'*oskar* au stade 9 du développement de l'ovocyte. On observe une colocalisation avec Staufen. (C) Localisation d'*oskar* au stade 9 du développement de l'ovocyte dans une lignée nulle pour Staufen. (D) Localisation de la protéine Staufen dans l'oeuf. (E) Localisation de *bicoid* dans l'oeuf. On observe une colocalisation avec Staufen. (F) Localisation de *bicoid* dans l'oeuf d'une lignée nulle pour Staufen. (G) Localisation de Staufen (rouge) au pôle basal lors de la division asymétrique des neuroblastes. (H) Localisation de *prospero* (rouge) au pôle basal lors de la division asymétrique des neuroblastes. (I) Localisation de *prospero* (rouge) lors de la division asymétrique des neuroblastes d'une lignée nulle pour Staufen. Tiré de (St Johnston, 2001).

en mesure de dimériser (Chekulaeva et al., 2006), aucun lien entre ce phénomène et Staufén n'a pour l'instant été établi.

Toujours chez la drosophile, Staufén est également requis pour la localisation du messenger *prospero* lors de la division asymétrique des neuroblastes. Les neuroblastes se divisent en un neuroblaste ainsi qu'en une cellule mère du ganglion (GMC). Au cours de la division, *prospero* et Staufén sont spécifiquement localisés au pôle basal du neuroblaste. Ils seront ensuite ségrégés spécifiquement dans la GMC (Figure 8G,H) (Broadus et al., 1998). Par contre, en absence de Staufén, *prospero* ne sera pas dirigé spécifiquement vers le pôle basal mais sera plutôt distribué de façon non organisée dans le neuroblaste (Figure 8I). De façon intéressante, c'est la protéine Miranda qui permet le ciblage de Staufén et de *prospero* lors de la division asymétrique et ce, grâce au dsRBD5 de Staufén (Fuerstenberg et al., 1998; Matsuzaki et al., 1998).

Chez les mammifères et en particulier chez la souris, une étude a permis de mettre en relief l'importance de Stau1 pour la localisation de l'ARN dans les neurones. Pour ce faire, on a employé comme rapporteur le 3'UTR de la CaMKII α , un messenger bien connu pour sa localisation synaptique, portant des sites de liaison à la protéine de la capsule du phage MS2. La coexpression de ce rapporteur avec la fusion de la protéine de la capsule de MS2 et de la protéine fluorescente verte (GFP) permet de suivre le déplacement de ce rapporteur dans les cellules en culture. C'est ainsi qu'il fut observé que dans les neurones

où la présence de Stau1 est diminuée par RNAi, le rapporteur 3'UTR CaMKII α -MS2 est sous représenté dans les dendrites et demeure à proximité du soma (Kanai et al., 2004).

1.4.3.2. La mémoire

La section 1.2.3 ci-dessus a souligné l'importance de la localisation d'ARNs messagers pour l'établissement de la mémoire. Le rôle de Staufén dans ladite localisation d'ARNs ayant été clairement établi, c'est donc sans surprise que des études tentant de faire le lien entre Staufén et la mémoire ont été conduites.

Une première étude, menée chez la drosophile, a permis de montrer que la transcription de Staufén était augmentée chez des mouches soumises à un entraînement olfactif espacé par rapport celles entraînées de façon massive (Dubnau et al., 2003). Il est généralement accepté dans la littérature qu'un entraînement olfactif espacé permet l'établissement de mémoire à long terme, ce que l'entraînement massif ne permet pas. Afin de confirmer ces résultats, les auteurs ont employé une lignée mutante pour Staufén sensible à la température (stau^{C8}/stau^{D3}). En entraînant de façon espacée des mouches stau^{C8}/stau^{D3} à la température permissive pour l'expression de Staufén, aucune différence notablement de mémoire olfactive n'a pu être notée par rapport à une lignée de type sauvage entraînée à la même température. Par contre, en faisant l'entraînement espacé des mouches stau^{C8}/stau^{D3} et de type sauvage à température restrictive pour l'expression de Stau1, on abolit l'établissement de la mémoire olfactive suite à l'entraînement

spécifiquement chez la lignée *stau^{C8}/stau^{D3}*. Ceci démontre donc l'importance du rôle de Staufen durant la formation de la mémoire à long terme chez *D. melanogaster*.

Plus récemment, une étude est arrivée à des conclusions similaires mais cette fois en employant des cultures de coupe d'hippocampe de rat comme modèle (Lebeau et al., 2008b). En effet, il a été montré que l'emploi d'un siRNA ciblant *Stau1* altérerait de façon significative la L-LTP par rapport à un siRNA contrôle. De façon intéressante, la E-LTP n'est pas affectée par la sous-expression de *Stau1*. Également, la morphologie des épines dendritiques des neurones où *Stau1* est diminué est affectée. Effectivement, les épines sont plus allongées, ce qui est généralement associé à un nombre augmenté de synapses silencieuses. Ces données tendent à démontrer que *Stau1* est important pour la plasticité à long terme et que les altérations de la L-LTP observées sont dues à un manque de transport et/ou de traduction localisée des messagers nouvellement transcrits.

1.4.3.3. La dérégulation de la traduction

C'est chez la drosophile que le groupe de Daniel St Johnston a montré que Staufen était requis non seulement pour la localisation postérieure du messenger *oskar* mais également pour la dérégulation de ce messenger une fois qu'il est bien localisé (Micklem et al., 2000). En effet, en étudiant l'effet de la délétion des différents dsRBD de Staufen, il a été remarqué que l'expression de *Stau^{ΔdsRBD5}* permettait la localisation appropriée d'*oskar* mais pas le sauvetage du phénotype abdominal d'une lignée nulle pour Staufen. C'est ainsi que l'absence de protéine Oskar au pôle postérieur malgré la présence d'*oskar* a permis de

confirmer le rôle de Staufen dans la dérégulation de la traduction et plus particulièrement l'implication du dsRBD5 dans ce phénomène.

1.4.3.4. La dégradation médiée par Stau1

La découverte par double-hybride chez la levure d'une interaction entre Stau1 et le facteur du NMD Upf1 suggérait l'implication de Stau1 dans ce phénomène. Par contre, il a été remarqué que Stau1 n'entretenait pas de lien avec les autres facteurs du NMD classique, tels Upf2 et Upf3 (pour revue voir (Stalder and Muhlemann, 2008)), et que Staufen n'était pas requis pour la dégradation de rapporteurs du NMD (Kim et al., 2005). Cependant, le fait de lier Stau1 en 3'UTR d'un messager rapporteur à l'aide du système MS2 stimule la dégradation Upf1 dépendante de cet ARN. Il a également été observé que la présence d'un site de liaison à Stau1 (SBS) dans le 3'UTR d'un ARN messager en diminuait la stabilité. C'est ce qui fut montré à l'aide du messager cellulaire Arf1 dont la délétion du SBS endogène en 3'UTR abolit la liaison à Stau1 et augmente la stabilité de l'ARN. C'est ce qui mena à la proposition du Staufen1-mediated decay (SMD) comme étant un mécanisme de régulation post-transcriptionnel des gènes et non pas un mécanisme de contrôle de la qualité des ARNs (Kim et al., 2005). Une étude subséquente a ensuite démontré que le SMD ne s'appliquait pas seulement à Arf1, mais bien à une panoplie importante de messagers cellulaires dont la quantité est augmentée lorsqu'on sous-exprime Stau1 et Upf1 (Kim et al., 2007). De plus, le SMD est augmenté lors de différenciation de cellules murines C2C12 de myoblastes à myotube. Ceci corrèle avec l'observation préalable de

l'augmentation de la quantité de Stau1 lors de ce phénomène (Belanger et al., 2003), suggérant que la modulation des niveaux cellulaires de Stau1 influence le SMD.

1.4.4. Les ARNs associés à Stau1

La section 1.4.3 ci-dessus vous a présenté les rôles connus de Staufen ainsi que les phénomènes auxquels cette protéine participe. Toutefois, il est possible que Stau1 soit impliqué dans une multitude d'autres phénomènes et de voies au sein de la cellule. Une façon d'élucider cette question est l'identification des messagers présents dans les RNPs de Stau1. C'est ce qu'a réussi à présenter l'équipe du Dr DesGroseillers récemment (Furic et al., 2008). Pour ce faire, des immunoprécipitations (IP) de la protéine Stau1-HA transfectée ont été conduites suivies de l'identification des ARNs présents dans les RNPs grâce à des micropuces d'ADN. Il en ressortit qu'environ 7% des messagers exprimés dans la lignée cellulaire HEK293T étaient associés à Stau1. De façon intéressante, près de 40% de ces ARNs ont été identifiés également dans des IPs de Stau2. Ceci confirme que malgré la similarité et la conservation entre Stau1 et Stau2, ces facteurs sont associés à des populations distinctes de RNPs tout en ayant des fonctions similaires.

Un point intéressant de cette étude est la distribution ontologique des messagers associés à Stau1. En effet, les ARNs associés à Stau1 codent pour des protéines impliquées dans une multitude de voies. On retrouve par exemple des quantités importantes d'ARNs codant pour des protéines du métabolisme cellulaire, des processus physiologiques cellulaires, du transport et de la localisation, de la transcription, de l'épissage alternatif, de

liaison aux ions métalliques et des activités catalytiques. Puisque ces phénomènes doivent être régulés finement afin de répondre aux besoins de la cellule, il a été proposé que la régulation post-transcriptionnelle de certaines sous-populations de messagers par Staufen pourrait permettre une telle régulation (Furic et al., 2008).

1.5. L'importance de l'homodimérisation pour les fonctions cellulaires des protéines liant l'ARN

Un mécanisme de modulation de l'activité des protéines qui a été maintenu au cours de l'évolution est l'homodimérisation/multimérisation. Ce phénomène relativement commun au sein de la cellule permet de maintenir un génome plus petit tout en offrant une grande flexibilité de régulation. L'homodimérisation est nécessaire par exemple pour la régulation enzymatique, la signalisation cellulaire et la liaison à l'ADN de certaines protéines. Les protéines liant l'ARN sont des constituants essentiels d'une multitude de voies cellulaires finement régulées. Ainsi, l'homodimérisation est importante pour les fonctions d'une partie de ces protéines lors des différentes étapes de la vie des ARNs messagers. La présente section vous montrera l'importance de l'homodimérisation des protéines PKR, ADAR, She2p et ELAV pour l'accomplissement de leurs fonctions.

1.5.1. PKR et la régulation de la traduction

La protéine kinase activée par l'ARN double-brin (PKR) est une enzyme qui peut produire plusieurs effets au sein de la cellule et qui a notamment un rôle critique dans la

défense de l'hôte envers les infections virales (pour revues voir (Garcia et al., 2006; Garcia et al., 2007; Langland et al., 2006; Taylor et al., 2005)). Cette kinase est constituée de deux domaines de liaison à l'ARN double-brin ainsi que d'un domaine kinase. PKR est une sérine/thréonine kinase membre de la famille des kinases phosphorylant le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . La phosphorylation du résidu S51 d'eIF2 α empêche le recyclage de ce facteur nécessaire à la traduction, ce qui mène à une inhibition généralisée de la synthèse protéique. Ceci permet donc d'inhiber la traduction des ARNm viraux, ce qui constitue le mécanisme de base par lequel PKR exerce son activité antivirale contre plusieurs virus à ADN et à ARN.

En absence de stress, PKR prend une forme de monomère inactif à cause de l'effet inhibiteur des dsRBDs qui interagissent avec le domaine kinase (Figure 9A). Afin de phosphoryler eIF2 α , PKR doit tout d'abord être activée par la présence d'ARN double brin (Clemens, 1997). Il est à noter que des duplex d'ARN d'une taille minimale de 30 pb sont requis afin d'activer PKR (Manche et al., 1992). La liaison au substrat ARN par les dsRBDs libérera le domaine kinase qui sera à ce moment libre de faire les interactions protéine-protéine requises pour l'homodimérisation. C'est sous sa forme de dimère que PKR pourra s'activer par autophosphorylation sur les thréonines 446 et 451 notamment (Figure 9B). Cette phosphorylation stabilise le dimère, ce qui augmente l'activité catalytique et permet la reconnaissance et la phosphorylation du substrat eIF2 α (Figure 9C).

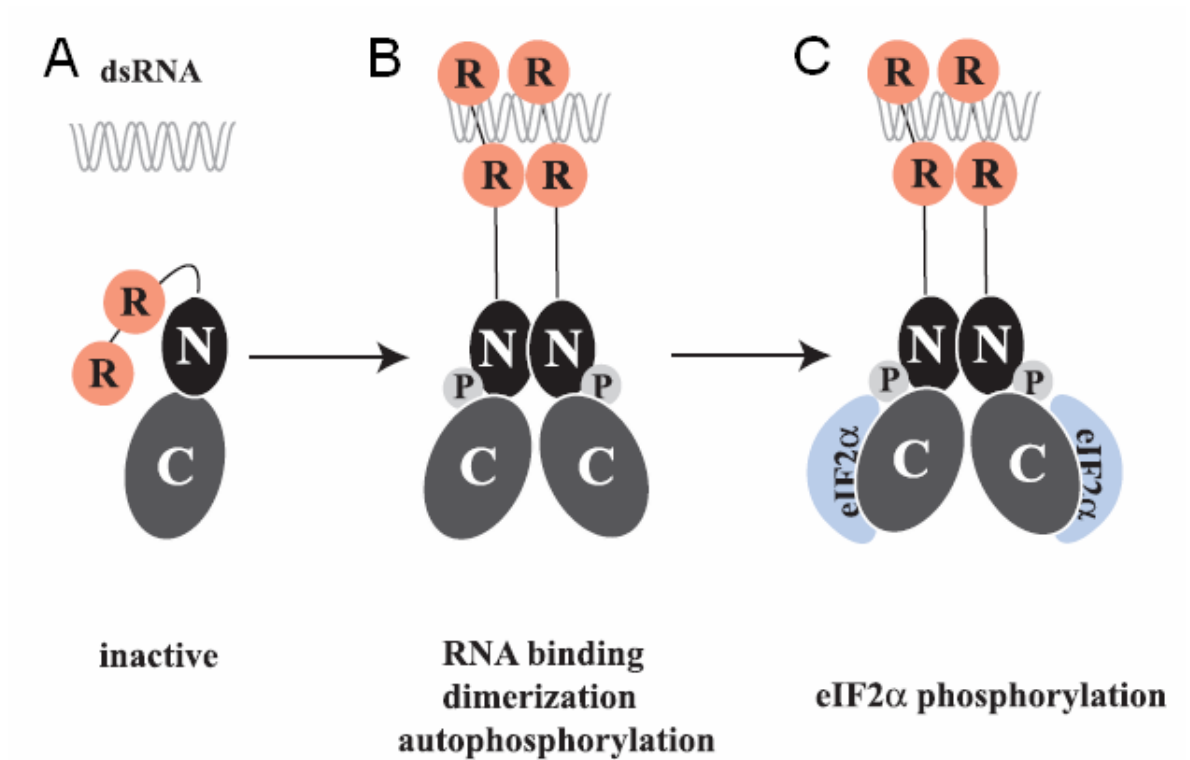


Figure 9 Représentation schématique de l'activation de PKR par l'ARN double-brin.

(A) Forme inactive monomérique de PKR. (B) Promotion de la dimérisation et de l'activation par la liaison à l'ARN double-brin. (C) Phosphorylation du substrat eIF2 α . R, dsRBD. N et C, lobes N et C-terminaux du domaine kinase.

Tiré de (Garcia et al., 2006).

Une étude récente a permis de situer dans le lobe N terminal du domaine kinase la région nécessaire à l'homodimérisation de PKR (Dey et al., 2005). Cet article a également montré que la dimérisation était requise pour l'autophosphorylation de la kinase. En effet, lorsque les résidus de l'interface de dimérisation sont mutés, l'autophosphorylation sur la thréonine 446 est presque totalement éliminée. De plus, ces mutations diminuent grandement les niveaux de phosphorylation d'eIF2 α . Ces résultats viennent donc souligner l'importance de la dimérisation pour la kinase PKR, ce qui est appuyé par le fait que des protéines cellulaires (Lee et al., 1994) et virales (Garcia et al., 2006) ciblent la dimérisation de PKR afin de moduler son activité régulatrice de la traduction.

1.5.2. She2p et la localisation de l'ARN

Tel que présenté à la section 1.2.1.1 ci-dessus, la protéine She2p fait partie du locosome d'*ASH1* et est requise pour la localisation de ce transcrit à la partie distale du bourgeon lors de la division asymétrique chez *S. cerevisiae*. Il est intéressant de noter que jusqu'à tout récemment, on ignorait via quel motif She2p était en mesure de lier l'ARN. En effet, l'absence de similarité entre She2p et d'autres protéines de liaison à l'ARN suggère que She2p n'appartient à aucune classe connue.

C'est une étude de la structure cristallographique de She2p qui a permis dans un premier temps d'identifier le domaine de liaison à l'ARN mais également de mettre en relief la structure de l'homodimère de She2p (Niessing et al., 2004). Cette équipe a pu déterminer que She2p lie l'ARN grâce à une tige-boucle hélicoïdale basique. Également, ils

ont montré par des expériences de chromatographie d'exclusion de taille que She2p était sous forme d'homodimère en solution. Ceci est intéressant puisque des mutations abolissant la dimérisation de She2p ont fortement diminué la capacité de celle-ci à lier l'ARN. Ces résultats suggèrent donc que la dimérisation de She2p est requise pour la reconnaissance ou la liaison du substrat *ASH1*. C'est ce qui fut confirmé par des essais *in vivo* dans une lignée déletée pour *SHE2*. Ainsi, dans cette lignée, les mutants abolissant la dimérisation n'étaient pas en mesure de localiser correctement *ASH1*, contrairement à la protéine de type sauvage.

1.5.3. ADAR et l'édition des ARNs messagers

L'édition des ARNs est un mécanisme permettant de produire plusieurs transcrits différents à partir du même gène. Il est ainsi possible de cette façon d'élargir le transcriptome et par conséquent le protéome. L'édition la plus fréquente est conduite par les protéines de la famille ADAR (Adenosine DeAminases that act on double-stranded RNAs). ADAR1, ADAR2 et ADAR3 sont en mesure de catalyser la conversion d'adénosines (A) spécifiques en inosines (I) sur des substrats d'ARN double-brin. Cette modification permet de produire un changement de codon mais également un changement de la structure de l'ARN. En effet, l'inosine ne peut s'apparier à l'uracile contrairement à l'adénosine. Ceci peut donc entraîner la séparation d'une tige double-brin par exemple (pour revue voir (Ohman, 2007)). Il est à noter que des études ont montré que l'édition des ARNs n'était pas

un phénomène restreint aux séquences codantes des ARNs. En effet, une large proportion des régions 5' et 3'UTR sont éditées de même que les introns (Levanon et al., 2004).

Les protéines ADAR1 et 2 sont requises pour le développement et la vie normale chez la souris (Higuchi et al., 2000; Wang et al., 2000). Ces protéines arborant plusieurs copies du dsRBDs en plus du domaine déaminase voient leur activité d'édition être fortement régulée (Cenci et al., 2008). Il n'est donc pas surprenant qu'on ait identifié, d'abord chez la drosophile, une structure en dimère pour ADAR (Gallo et al., 2003). C'est plus récemment que fut mise en lumière la capacité d'ADAR2 d'homodimériser chez les mammifères. En effet, c'est grâce à son dsRBD1 qu'ADAR2 peut dimériser mais à ce moment, la nécessité de la présence d'ARN pour la dimérisation n'était pas claire (Poulsen et al., 2006). Un autre groupe a démontré que la dimérisation d'ADAR2 était requise pour l'activité enzymatique de cette protéine (Valente and Nishikura, 2007). Cette équipe a d'abord confirmé que l'homodimérisation d'ADAR2 était indépendante de la présence d'ARN puisque des mutants d'ADAR2 dont la capacité à lier l'ARN a été abolie sont en mesure de s'associer à la protéine de type sauvage. Ensuite, ils ont montré que l'activité catalytique d'un dimère était fortement compromise lorsqu'un des membres de la paire n'est pas en mesure de lier l'ARN ou d'éditer correctement les substrats. Il ressort de ces études que la dimérisation d'ADAR pourrait être une cible intéressante de régulation de l'activité d'édition de l'ARN au sein de la cellule.

1.5.4. ELAV et l'épissage

ELAV (embryonic lethal abnormal visual system) fait partie d'une famille de protéines portant trois RRM (RNA recognition motif) et dont l'expression est principalement située dans les neurones (pour revue voir (Pascale et al., 2008)). Les membres de cette famille sont impliqués tant dans la maturation des pré-ARNm que dans la stabilité des ARNs cytoplasmiques. ELAV lie des substrats d'ARN portant des séquences riches en AU qui sont fortement représentées dans les régions 3'UTR et dans les introns. Chez la mouche à fruit, ELAV est bien connu pour son rôle dans l'épissage alternatif des transcrits *ewg* et *nrg* afin de produire des isoformes neuro-spécifiques (Koushika et al., 2000; Lisbin et al., 2001).

En 2005, un article a fait état de la capacité d'ELAV à former des multimères sur le dernier intron d'*ewg* (Soller and White, 2005). En effet, ELAV adopte une conformation en dodécamère sur cet intron et la formation de ce complexe nécessite la présence d'une série de motifs AU₄₋₆. Tout récemment, un groupe a mis en évidence l'importance de trois courtes séquences du RRM3 d'ELAV pour sa multimérisation (Toba and White, 2008). En effet, ces trois séquences sont suffisantes et nécessaires pour permettre la multimérisation d'ELAV. Ils ont également montré que la mutation de ces séquences du RRM3 affectait fortement la capacité d'ELAV à réguler l'épissage du transcrit *nrg*, ce qui souligne grandement l'importance de la multimérisation d'ELAV pour ce phénomène. De façon intéressante, les protéines de la famille ELAV de mammifères semblent également être en

mesure de multimériser ce qui suggère que c'est grâce à ce mécanisme qu'elles peuvent mener à bien leur fonction sur les ARNs liés.

2. Hypothèses de travail

Au moment de débiter cette thèse, il n'existait aucune preuve que Stau1 était en mesure de réguler la traduction d'un ARN messager chez l'humain. Toutefois, une étude avait montré que Staufen pouvait déréguler la traduction du messager *oskar* une fois que ce dernier est bien localisé dans l'ovocyte de mouche à fruit. Également, le lien entre Stau1 et le ribosome avait été bien établi chez l'humain. La possibilité que Stau1 soit impliqué dans un mécanisme de régulation traductionnelle était donc envisageable. De plus, plusieurs protéines liant l'ARN double-brin de la famille de Stau1 étaient connues pour leur rôle dans la traduction de certains messagers. Également, des données préliminaires obtenues au laboratoire suggéraient que Stau1 était en mesure de former des complexes homomultimériques. C'est à partir de ces données que nous avons formulé l'hypothèse suivante :

Stau1 est en mesure de stimuler la traduction de sous-populations spécifiques de transcrits au sein de la cellule par un mécanisme régulé.

3. Résultats

3.1. Article 1 : Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs

3.1.1. Mise en contexte

Au moment de débiter ces travaux, il avait été montré chez la drosophile que Staufén avait la capacité de dérèprimer la traduction du messenger *oskar* au pôle postérieur de l'ovocyte. Également, une étude avait décrit l'association au ribosome de la protéine Staufén1 humaine. Par contre, aucun ARN messenger cellulaire lié par Staufén n'avait été identifié chez les mammifères. Il était toutefois connu que la séquence TAR du virus HIV-1 formait structure secondaire en tige-boucle. Il avait également été montré que la présence de cette structure dans la région 5' non-traduite d'un ARN messenger en diminuait la traduction. Notre intérêt s'est donc porté sur la vérification de la capacité de Staufén1 de mammifère à dérèprimer la traduction d'un ARN messenger en utilisant le modèle de la structure TAR de HIV-1. Cet article présente la validation de l'hypothèse selon laquelle Staufén1 peut dérèprimer la traduction d'un ARN messenger.

Notes

-Contribution de chacun des auteurs :

S. Dugré-Brisson : Essais de sédimentation dans les lysats de réticulocytes de lapin, essais de traduction dans les HEK 293T et les MEFs PKR^{-/-}, buvardages Northwestern, essais de traduction avec les mutants de Stau1, RT-PCR, buvardages northern en « slot-blot », essais de traduction avec les rapporteurs SBS-Rluc et MS2bs-Rluc.

G. Elvira : Production et purification de protéines recombinantes, essais de traduction dans les lysats de réticulocytes de lapin, essais de liaison avec la structure TAR, essais d'activité hélicase.

K. Boulay : Gradients de sucrose et « run-offs ».

L. Chatel-Chaix : Mise au point des shRNAs ciblant Stau1.

A. J. Mouland : Expérience préliminaire.

L. DesGroseillers : Supervision générale.

‡ Contribution égale des deux premiers auteurs tel que mentionné en première page de l'article.

Article publié dans *Nucleic Acids Research*, 2005, Vol. 33, No. 15, 4797-4812.

Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs

**Samuel Dugré-Brisson^{1‡}, George Elvira^{1‡}, Karine Boulay¹, Laurent Chatel-Chaix^{1,2},
Andrew J. Mouland² and Luc DesGroseillers^{1,3}**

**Département de Biochimie¹, and Centre de Recherche en Sciences Neurologiques³,
Université de Montréal and Lady Davis Institute for Medical Research and McGill
University², Montréal, Canada, H3C 3J7.**

Short title: Stau1 is involved in translational derepression

[‡] These two authors contributed equally to this work

Address correspondence to:

Dr Luc DesGroseillers,

Department of Biochemistry, University of Montreal,

P.O. Box 6128, Station Centre Ville, Montreal, Qc, Canada H3C 3J7,

Phone: 514-343-5802,

Fax: 514-343-2210,

Email: luc.desgroseillers@umontreal.ca.

3.1.2. Abstract

ABSTRACT

Staufen1 is a component of transported ribonucleoprotein complexes. Genetic work in *Drosophila* has suggested that Staufen plays a role in the de-repression of translation of *oskar* mRNA following localization. To determine whether Staufen1 can play a similar role in mammals, we studied translation of transcripts in the presence or absence of Staufen1. Translationally-repressed mRNAs were generated by fusing the structured HIV-1 trans-activating response (TAR) element to the 5' end of a reporter transcript. In rabbit reticulocyte lysates and in mammalian cultured cells, the addition of Staufen1 resulted in the upregulation of reporter activity when translation was driven by the TAR-bearing RNA. In contrast, Staufen1 had no effect on translation of efficiently translated mRNAs lacking an apparent structured 5' end, suggesting that Staufen1-binding to the 5' end is required for enhanced translation. Consistently, Staufen1 RNA-binding activity is necessary for this translational effect. In addition, similar upregulation of translation was observed when Staufen1 was tethered to the 5' end of mRNAs via other structured RNAs, the highest level of translational increase being obtained with the bona fide Staufen1-binding site of the Arf1 transcript. The expression of Staufen1 promoted polysomal loading of TAR-luciferase transcripts resulting in enhanced translation. Our results support a model in which the expression of Stau1 and its interaction with the 5' end of RNA and ribosomes facilitate translation initiation.

3.1.3. Introduction

INTRODUCTION

Intracellular localization of mRNA is a universal phenomenon that is conserved in plants and animals (1-3). It has been shown to be important for cell motility (4), asymmetric cell division (5), axis formation during development (6), synaptic plasticity (7) and long-term potentiation (8). One general concept that emerges from studies on mRNA localization is the link that exists between localization and translation (3;9). mRNA is translationally silent during transport, but its translation becomes de-repressed following transport, resulting in localized protein synthesis. While several mechanisms to achieve translational repression during transport have been described, these largely involve the association of a repressor to the 3'UTR (10-14) or the presence of an inhibitory RNA structure in the 5'UTR to block translational initiation (15;16).

In contrast, there are few details known about the mechanism that controls the de-repression of translation following mRNA transport. Work in *Drosophila* has suggested that RNA-binding proteins can play a role here. Staufen, for instance, is a double-stranded RNA-binding protein (17) that is required for the de-repression of *oskar* mRNA translation in oocytes (10;18). The mechanism underlying this function of Staufen is not known. In mammals, Staufen1 (Stau1⁵⁵) (19;20) is a component of RNA transport granules and ribosome-free RNA particles (21;22). It is believed to play important role(s) in the transport of RNA to dendrites (23-25) and because it is also associated with polysomes (19;20;26-28), it is likely to be involved in the translation of mRNAs.

To address the role of Staufen1 in translation, we used the well studied model of translational repression involving the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) trans-

activating response region (TAR). The TAR RNA sequence is present at the 5' end of all HIV-1 transcripts and forms a stable secondary RNA structure consisting of a stem-loop with a bulge. It inhibits translation by making the RNA cap structure inaccessible to translation initiation factors (29) and more generally by activating the interferon response pathway (15;30;31). In addition to the viral protein Tat (32), many cellular factors including the double-stranded RNA-dependent kinase (PKR) (33), the TAR-RNA binding protein (TRBP) (34), the RNA helicase A (RHA) (35) and the La autoantigen (36) have been shown to interact with the RNA TAR structure. Some of these proteins also regulate translation of TAR-containing transcripts. PKR becomes activated when bound to TAR (15;31). Activated PKR phosphorylates the translation initiation factor 2α (eIF-2 α) thus causing general inhibition of translation (37-40). In contrast, TRBP which was identified in a large-scale screen for cellular TAR interacting proteins (34) partially relieves the TAR-induced inhibition of translation through a PKR-independent pathway (41). Similarly, the La autoantigen stimulates translation of TAR-bearing transcripts through its ATP-dependent helicase activity that disrupts the TAR secondary structure (42;43).

In this report, we studied the role of Stau1⁵⁵ in translation in both rabbit reticulocyte lysates and in human embryonic kidney (HEK)293T cells. To generate translationally-repressed transcripts, we fused double-stranded RNA structures to the 5' end of reporter transcripts. Our studies show that Stau1⁵⁵ stimulates translation of structure-repressed mRNA in a mechanism that requires Stau1⁵⁵-binding to the 5' end of transcripts. Therefore, Stau1⁵⁵ expression and binding are important factors to regulate translation of some RNAs and to contribute to the derepression of translation following mRNA localization.

3.1.4. Materials and Methods

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents - Mouse polyclonal anti-ribosomal L7/SPA protein antibodies were obtained from Novus Biologicals (Littleton, CO, USA), mouse monoclonal anti-tubulin antibodies from ICN (Aurora, OH, USA), rabbit polyclonal anti-calnexin antibodies from Stressgen Biotechnologies (Victoria, BC, Canada) and anti-mouse and anti-rabbit polyclonal antibodies conjugated to horseradish peroxidase from DakoCytomation (Mississauga, ON, Canada). To generate Stau1⁵⁵ monoclonal antibodies, bacterially expressed human GST-Stau1⁵⁵Δ2 was affinity purified on a glutathione sepharose matrix (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ, USA) and eluted from the column by cleavage with thrombin. Mice were injected with 10 μg of antigen per injection. Following serum conversion, spleens of positive mice were isolated and monoclonal antibodies (11C6) were prepared as described previously (44). G418 and 2-aminopurine were purchased from Sigma (Oakville, ON, Canada).

cDNA construction - Plasmids coding for Stau1⁵⁵Δ2-his₆ (formerly named HFBDQ-his₆), NEP-his₆, Stau1⁵⁵-HA₃ (20) and Stau1^{55F}-HA₃ (26) were previously described. Plasmids containing mutations in TAR were generated from the p48 (pCD, pEF, pGH, pIJ) or p49 (pAB) plasmids (generous gifts from K.T. Jeang, NIH/NIAID Bethesda, MD) by ligation of double-stranded synthetic oligonucleotides (Table I) within the TAR sequence. The p48 and p49 plasmids were first digested with *SmaI/EcoRI* and *AvaI/EcoRI*, respectively, treated with the Klenow fragment to blunt ends and ligated to remove the *SacI* restriction site in the multi-cloning site. Then, plasmids were digested with *SacI* in the TAR sequence and either *BamHI* (pAB), *BglII* (pCD) or *HindIII* (pEF, pGH, pIJ), purified and ligated with oligonucleotides. La-

his₆ plasmid was obtained by subcloning the *Bam*HI/*Hind*III fragment of La-pBS SK (a generous gift from K.T. Jeang) in frame with the his₆ tag in the pQE31 expressing plasmid (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). pcDNA3 RSV-*Rluc* plasmid was constructed by subcloning the *Hind*III-*Xba*I PCR fragment from p*Rluc*-N1(h) (PerkinElmer Biosignal Inc, Montreal, Qc, Canada) into the *Xba*I-*Hind*III sites of pcDNA3 RSV plasmid (45). The PCR reaction was carried out with 2 units of Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Pickering, ON, Canada) and the sense 5'-CTCACGCGTCTGCAG-3' and antisense 5'-GGCTGATTATGCTCTAGATCG-3' primers. The pcDNA3 RSV-TAR-*Rluc* plasmid was constructed by subcloning the TAR-containing *Hind*III fragment of pSp6TAR-CAT plasmid (a generous gift from E. Cohen, University of Montreal) into the *Hind*III site of pcDNA3 RSV-*Rluc*. The sh1 and sh2 plasmids were obtained by the PCR SHAGging strategy (46). Two rounds of PCR were carried out. A first PCR was done on the pGEM-U6 plasmid (a generous gift from G. Ferbeyre, University of Montreal) with 50 pmol of U6 sense 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3' and sh1 5'-AAAAAAATAAGGATCAACAGGCTTATACATCGGCTCAAGCTTCAACCAATGTATAAGCCTGTTGACCCTTACGGTGTTTCGTCCTTTCCACAA-3' or sh2 5'-AAAAAACACCTCCCACACACAGACATCGGCCCATCAAGCTTCACGGACCAATGTC TGTGTGTGGGAGGTGCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAA-3' antisense primers. PCR was carried out with 100 ng pGEM-U6 template, 5 units AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems), 4% DMSO, 0.2 mM dNTPs and 1.5 mM MgCl₂ (95°C for 3 minutes, 30 cycles at 95°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 1 min, followed by a 10 min incubation at 72°C). PCR products were purified on low-melt agarose gel, and ethanol precipitated. They were then cloned as followed: using the first PCR SHAG products as template, a second PCR amplification was

carried out with 0.2 μ M of U6 sense 5'-ACAGAATTCGATTAGGTGACACTATAG-3' (underlined: the *Eco*RI restriction site) and sh1 antisense 5'-ACACTCGAGAAAAAATAAGGATCAACAGGCTTA-3' (underlined: the *Xho*I restriction site) or sh2 antisense primers (5'-ACACTCGAGAAAAAACACCTCCCACACACAGAC-3' (underlined: the *Xho*I restriction site) at 95 °C for 1 min, 58 °C for 1 min, 72 °C for 1 min for 35 cycles. The resulting PCR products were digested with *Eco*RI/*Xho*I and subcloned in pBluescript KS plasmid (Stratagene). The Stau1⁵⁵ Δ sh1-HA₃ plasmid was PCR amplified from Stau1⁵⁵-HA₃ plasmid with the all-around technique using the sense 5'-CTTACTCTCGGACGCAGTCCACCTA-3' and antisense 5'-TAGGTGGACTGCGTCCGAGAGTAAG-3' oligonucleotide primers. Similarly, Stau1^{55KK}-HA₃ was PCR amplified from Stau1⁵⁵-HA₃ plasmid using the sense 5'-AGCGCGGCGATTTC AAAGAAAAATGCC-3' and antisense 5'-AATCGCCGCGCTTTTCCCTTCACC-3' primers.

The MS2-BS-Rluc plasmid was obtained by subcloning the *Kpn*I digestion fragment of the pSL-MS2 plasmid (a kind gift from P. Chartrand University of Montreal) in the *Kpn*I site of the pcDNA3 RSV-Rluc plasmid. The pcDNA3 RSV SBS-Rluc plasmid was obtained by PCR amplification of the Staufen1 binding site (SBS) from the pSport-Arf1 plasmid using the sense 5'-CAGCTCCGGAACCAGAAGTGAAC-3' and antisense 5'-AGGACCCGGGAACACAGCGACTCCTGGAGG-3' (underlined: the *Xma*I restriction site) at 95°C for 1 min, 57°C for 45 sec, 72°C for 45 sec for 35 cycles. PCR products were kinased and digested with *Xma*I restriction enzyme, purified and subcloned in the *Eco*RV/*Xma*I sites of pBluescript SK. pBluescript SK SBS plasmid was digested by *Hind*III/*Bam*HI and the digestion fragment was subcloned in the *Hind*III/*Bam*HI sites of the pcDNA3 RSV Rluc plasmid.

Recombinant protein production and purification – Bacterially-expressed Stau1⁵⁵Δ2-his₆ and NEP-his₆ were induced for 3 hours with 1 mM IPTG and purified as described before (20). Aliquots of purified proteins were stored at -80°C until use. Protein concentration was determined by the BioRad dye reagent and bovine serum albumin (BSA) as standard.

In vitro assays - The SpIII-10 CAT and pSp64TAR-CAT plasmids (generous gift of E. Cohen, University of Montreal) were linearized at the *Bam*HI site, transcribed in vitro using the Sp6 RNA polymerase and GpppG CAP analog and used for in vitro translation in rabbit reticulocyte lysates (RRL) as described (42). One fifth volume of CAT and one volume of TAR-CAT translation products were either loaded on gel and detected by autoradiography or quantified by ELISA as indicated by the manufacturer (Roche Biochemicals, Laval, Qc, Canada). For the in vitro ribosome pull-down assay, 250 ng of Stau1⁵⁵Δ2-his₆, in the presence or absence of 50 ng of TAR-CAT, were incubated with RRL for 1 h. The reaction mix was diluted to 300 µl with ice-cold isotonic buffer (110 mM KOAc, 2 mM MgOAc, 10 mM HEPES-KOH pH 7.3, 2 mM DTT) and centrifuged in a Beckman SW 50.1C rotor for 45 min at 100,000 x g at 4 °C. The ribosome-enriched pellet was harvested and analysed by SDS-PAGE. The helicase assay was performed as described (43). Northwestern and filter binding assays were carried as described (20). For immunoprecipitation, transfected cells were lysed in 600 µl of lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.5% Triton X-100, EDTA 15 mM and DTT 1 mM). Cells extracts were pre-cleared with 60 µl of 50% v/v Protein A-Sepharose slurry (Roche, Laval, QC, Canada) for 1 hour and then incubated with 3 µl of anti-HA ascite fluid (12CA5) at 4°C for 2 hours and with 150 µl of 50% v/v Protein A-Sepharose slurry at 4°C for 2 hours.

RNA steady-state level - HEK293T cells were cultured in 12-well dishes and transfected with 100 ng of pcDNA3 RSV-Rluc or pcDNA3 RSV-TAR-Rluc in the absence or in the presence of increasing quantities of pcDNA3 RSV-Stau1⁵⁵-HA₃ with FuGene6 transfection reagent (Roche, Laval, QC, Canada). Twenty-four hours post-transfection, total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen Life Science, Burlington, ON, Canada) and treated with DNaseI for 1 hour at 37 °C. Rluc, TAR-Rluc and GAPDH RNAs were reverse-transcribed at 42 °C for 17 minutes using 1 µg of total RNA, 5 pmol of Rluc (5'-CAGCACTCTCTCCACGAAGC-3') and GAPDH (5'-CAAAAGTTGTCATGGATGACC -3') antisense primers using the GENEAMP RNA PCR core kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Rluc (5'-GCAAGGTGTACGACCCCG-3') and GAPDH (5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') sense primers (250 ng) were added for PCR amplification (95°C for 2 minutes, followed by 17 cycles at 94°C for 1 minute, 54°C for 1 minute and 72°C for 1 minute). Resulting products were resolved on a 1.25% agarose gel. Similarly, 50 ng of CAT or TAR-CAT RNAs were incubated with RRL at 30°C for 0, 7.5, 15 or 30 minutes in the presence of 40 µg/µl of G418. RNA was extracted with Trizol reagent and reverse transcribed using 5 pmol of CAT antisense primer (5'-CCACTCATCGCAGTACTGTTG-3'). PCR reactions were carried out at 95 °C for 2 minutes, followed by 14 cycles at 94°C for 1 minute, 52.5°C for 1 minute and 72°C for 1 minute using 250 ng of CAT sense primer (5'-CCTATAACCAGACCGTTCAGC-3') and antisense primer (5'-CCACTCATCGCAGTACTGTTG-3'). Resulting products were resolved on a 1.5% agarose gel.

Transfection and luciferase assays - HEK293T cells and PKR^{-/-} MEF (a generous gift from A. Gagnon, McGill University) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen Life Science) supplemented with 10% Cosmic calf serum (Hyclone, Logan, UT,

USA), 5 µg/ml of penicillin-streptomycin and 2 mM L-Glutamine (Invitrogen Life Science). To test the role of Stau1 in translation, cells were transfected with FuGene6 (Roche Biochemicals) using 100 ng of pcDNA3 RSV-Rluc or pcDNA3 RSV-TAR-Rluc and increasing concentrations (0, 50, 100, 500 ng) of plasmid coding for Stau1⁵⁵-HA₃ or its mutants. Total amount of transfected DNA was adjusted to 600 ng with the pcDNA3 RSV plasmid. Cells were harvested 24 hours post-transfection in 100 µl of lysis buffer (0.1 M Tris-Cl pH 7.9, 0.5% NonidetP40, 1mM DTT) for 5 minutes on ice. Twenty five µl of the extracts and 5 µM Coelenterazine H (Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) were used for *Renilla reniformis* luciferase assays. Luminescence was quantified with a Fusion α-FP (Perkin Elmer-Canberra Packard BioScience) by measuring emitted light at 475-480 nM. To knock-down expression of Stau1, HEK293T cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Science) using 700 ng of the silencing sh1 or the non-silencing sh2 plasmids. For translation assays, cells were re-transfected 24 hours later using FuGene6 (Roche) and plasmid DNA as described above. Knock-down rescue was done with 300 ng of plasmid coding for Stau1⁵⁵Δsh1-HA₃.

Cell fractionation on sucrose gradients – Polyribosome profile was analyzed as described (26). Briefly, transfected HEK293T cells were incubated for 20 min with cycloheximide (100 µg/ml), washed in cold PBS and isotonic buffer and lysed in hypotonic buffer supplemented with cycloheximide (100 µg/ml). For the run-off experiments, cells were incubated for 30 min with sodium azide (25 mM) instead of cycloheximide. Cytoplasmic extracts (corresponding to approximately 20 OD₂₆₀) were centrifuged on a continuous 10-40% or 15-45% sucrose gradient containing 100 mM KCl, 10 mM KOAc, 2 mM MgOAc, 1 mM DTT, 5 mM Hepes-KOH (pH 7.3), with or without cycloheximide (100 µg/ml) in a SW41 rotor (Beckman) at 160 000 x g for

150 min at 4°C. Fourteen fractions of ~800 µl were recovered and the ribosomal profile was monitored at OD₂₅₄ with a gradient fractionator (ISCO, Lincoln, USA). Twenty five µl of each fraction were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. For RNA analysis, total RNA was extracted from a 250 µl aliquot of each fraction by adding an equal volume of denaturing buffer [7 M urea, 1% (w/v) SDS, 350 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)] followed by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. RNA samples were incubated for 5 min at 65°C in RNA denaturing solution [66% (v/v) formamide, 8% (w/v) formaldehyde, 1X MOPS electrophoresis buffer] and slot-blotted onto nylon membrane using a HybriSlot apparatus (Gibco BRL). Membranes were hybridized with a random-prime ³²P-labeled *R*luc DNA fragment, exposed overnight and revealed by autoradiography.

3.1.5. Results

RESULTS

Stau1⁵⁵ stimulates translation of inefficiently translated transcripts in RRL - To determine whether Stau1⁵⁵ regulates translation, we first set-up an in vitro translation assay using rabbit reticulocyte lysates (RRL). Translation efficiencies of capped chloramphenicol acetyl transferase (CAT) RNA and TAR-CAT RNA (Fig. 1A) were compared. Similar to previous data (29;47), the translation of a transcript that contains TAR at the 5' end is repressed in RRL (Fig. 1B). Then, bacterially expressed and purified Stau1⁵⁵Δ2-his₆ or NEP-his₆ as control (Fig 1C) were tested for their capacity to associate with ribosomes as reported in cultured cells (26). Stau1⁵⁵Δ2-his₆ was used instead of the full-length Stau1⁵⁵ because this protein is more soluble than full-length. RRL were incubated in the presence or absence of 250 ng of recombinant Stau1⁵⁵Δ2-his₆ and extracts were centrifuged at 100 000 x g for 45 minutes to pellet ribosomes. Ribosomal pellets were separated by SDS-PAGE and analysed by Western blotting using anti-Stau1 and anti-L7 ribosomal protein antibodies. After centrifugation, recombinant Stau1⁵⁵Δ2-his₆ was found in the pellet with endogenous Stau1 and ribosomes (Fig. 1D). The addition of TAR-CAT RNA had no effect on Stau1 quantities in the ribosomal pellet. When centrifuged in the absence of RRL, Stau1⁵⁵Δ2-his₆ was not detected in the pellet (Fig. 1D). These results show that purified Stau1⁵⁵Δ2-his₆ associates with ribosomes in RRL in the presence or absence of added RNAs and that it is not over-represented as compared to endogenous Stau1 in this assay.

RRL were then incubated with CAT or TAR-CAT transcripts (4 μg/ml). At this RNA concentration, the translation capacity of RRL was not saturated and a 17-fold repression of translation of the TAR-CAT RNA was observed as compared to translation of CAT RNA (Fig. 1B). Increasing concentrations of recombinant Stau1⁵⁵Δ2-his₆ or NEP-his₆ were tested for their

ability to stimulate translation. Stau1⁵⁵Δ2-his₆ enhanced translation of the repressed TAR-CAT RNA in a dose-dependent manner reaching 15-fold (Fig. 1E). This effect was specific since NEP-his₆ had no effect on TAR-CAT RNA translation. In contrast, Stau1⁵⁵Δ2-his₆ did not markedly affect translation efficiency of CAT RNA, showing a 2-fold increase (Fig. 1E). A sensitive CAT ELISA was also used to quantify the in vitro synthesis of CAT. These assays demonstrated that Stau1⁵⁵Δ2-his₆ increases translation of TAR-repressed transcripts by 10-fold and that of normally translated mRNAs by only 2-fold (Fig. 1F).

Stau1⁵⁵ stimulates translation of TAR-containing transcripts in mammalian cells – The effects of Staufen on translation efficiency were then measured in mammalian HEK293T cells. Cells were transfected with plasmids that expressed either *Renilla reniformis* luciferase (*Rluc*) or TAR-*Rluc* transcripts. The TAR-mediated translational repression was also observed in this context showing a 2-fold decrease in luciferase activity as compared to that of the *Rluc* transcript (Fig. 2A). HEK293T cells were then co-transfected with increasing amounts of Stau1⁵⁵-HA₃ expressor construct (Fig. 2B) and either *Rluc* or TAR-*Rluc* plasmids. As shown in Figure 2A, Stau1⁵⁵-HA₃ stimulated translation of TAR-*Rluc* RNA 2-fold when compared to TAR-*Rluc* RNA translation in the absence of transfected Stau1⁵⁵-HA₃. In contrast, it had no effect on translation of *Rluc* transcript as indicated by a stable luciferase activity. Therefore, Stau1⁵⁵-HA₃ rescued the inhibition imposed by the TAR sequence on the translation of TAR-*Rluc* transcripts.

In order to examine the effect of Staufen on translation, we then used RNAi to knockdown Staufen expression on HEK293T cells expressing the *Rluc* transcripts as above. Short hairpin (sh) RNA-expressing plasmids (Fig. 2C) were used to knock-down endogenous expression of Stau1. sh1 was shown to result in a 92% decrease in Stau1 protein expression (Fig.

2D). Therefore, sh1- (silencing) or control sh2- (non-silencing) expressing plasmids were co-transfected with plasmids that expressed either *Rluc* or TAR-*Rluc*. Sh1 caused a significant 30% decrease ($p \leq 0.05$) in luciferase activity in cells expressing the TAR-*Rluc* transcript (Fig. 2E). In contrast, sh1 had no effect on luciferase activity when the *Rluc* transcript was expressed. sh2 did not modulate luciferase activity when either RNA was expressed (Fig. 2E). In an attempt to demonstrate that the effect of Staufén on translation was indeed due to Staufén, we performed an experiment in which sh1 was used to knockdown expression of endogenous Staufén, but co-expressed Staufén in trans using a vector that does not have the sh1 target sequence (Stau1⁵⁵Δsh1-HA₃, Luo and DesGroseillers, unpublished) (Fig. 2C, D). The results showed that the effects were specific to Staufén expression (Fig. 2E). Taken together, the results obtained from three different approaches show that Stau1⁵⁵ modulates the expression of translationally repressed TAR-containing transcripts but has no effect on efficiently translated mRNAs.

Stau1⁵⁵-dependent translational stimulation is independent of PKR activity - The ability of Stau1⁵⁵ to modulate the expression of TAR-repressed transcripts was distinguished from a competition with PKR for binding the dsRNA TAR structure by in vitro translation assay in the presence of 2-aminopurine (2-AP), a Ser/Thr kinase inhibitor (48). As shown before (49), 2-AP treatment of RRL slightly increased translation of the TAR-CAT transcript 2-fold likely by relieving a partial translational repression imposed by PKR. However, increasing concentrations of Stau1⁵⁵Δ2-his₆ still stimulated translation of the TAR-containing transcript 8-fold. This shows that 2-AP did not prevent Stau1⁵⁵-dependent activation of translation (Fig. 3A,B). In contrast, 2-AP prevented the 2-fold induction observed with Stau1⁵⁵Δ2-his₆ on CAT RNA translation (Fig.

3A,B), showing that, in this case, the increase in translation that is mediated by Staufen may be PKR-dependent.

To confirm these results, we tested the effects of Stau1⁵⁵ in PKR-deficient cells (PKR^{-/-}) (50). PKR^{-/-} cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA₃ and either Rluc or TAR-Rluc. As observed in HEK293T cells, Stau1⁵⁵-HA₃ increased translation of TAR-Rluc mRNA by two-fold whereas it has no effect on Rluc transcripts (Fig. 3C). Altogether, our results show that the Stau1⁵⁵-stimulating effect on TAR-bearing RNA translation is achieved through a PKR-independent pathway.

Stau1⁵⁵ binds to the TAR RNA structure - We next determined whether Stau1⁵⁵ binds the TAR RNA structure in vitro since it is the only difference between the Rluc and TAR-Rluc transcripts. Filter binding and Northwestern assays (20) were used to examine this. These analyzes have allowed us to show that Stau1⁵⁵Δ2-his₆ binds the TAR-RNA structure with high affinity with a K_d of 3.5 nM (Fig. 4A). Several mutants that disrupt specific regions of the TAR structure (Fig. 4B; (34)) were tested to map the Stau1⁵⁵Δ2-his₆ binding site. Whereas mutations in the lower stem, in the bulge or in the loop did not abolish binding of Stau1⁵⁵Δ2-his₆, mutations in the upper stem between the bulge and the loop were critical (Fig. 4 A,C). As control, NEP-his₆ did not bind TAR RNA (not shown). Altogether, these results support a model in which Stau1⁵⁵Δ2-his₆ binds to the TAR RNA structure and this may be important for the observed translational enhancement of RNAs that possess structured 5' regions.

Stau1⁵⁵ RNA-binding activity is required for TAR-induced translational activation – Since Stau1⁵⁵ binds the TAR RNA structure at the 5'end of the TAR-Rluc transcript, we then tested

whether Stau1⁵⁵ binding to RNA is required for the observed up-regulation of TAR-Rluc translation. Two mutants, Stau1^{55F}-HA₃ (26) or Stau1^{55KK}-HA₃ (Martel and DesGroseillers, submitted) (Fig. 5A), were first tested for their capacity to bind the TAR RNA structure in vitro. Northwestern assays using immunoprecipitated proteins isolated from HEK293 cells showed that, in contrast to Stau1⁵⁵-HA₃, both mutants were impaired in their RNA-binding activity (Figure 5B). Then, HEK293 cells were co-transfected with plasmids coding for either Stau1^{55F}-HA₃ or Stau1^{55KK}-HA₃ and with either TAR-Rluc or Rluc vectors. Western blot analysis showed that the levels of expression of the mutated proteins were quite similar to that of Stau1⁵⁵-HA₃ (Fig. 5C). However, these two mutants failed to stimulate the activity of either reporter (Fig. 5D). In the same experiment, Stau1⁵⁵-HA₃ stimulated translation of TAR-luciferase RNA 2-fold. These results suggest that Stau1⁵⁵ binding to RNA is critical for enhanced translation of TAR-containing transcripts.

The effects of Stau1⁵⁵ are at the level of translation - Three non-exclusive mechanisms may explain how Stau1⁵⁵ modulates translation of TAR-bearing transcripts: 1) increase in stability of TAR-containing RNA, 2) unwinding activity of Stau1 of the TAR structure and/or 3) direct binding to ribosomes or to translation factors and modulation of their activity. To distinguish between an effect on TAR-bearing mRNA itself and an effect on the translational machinery, we assessed the ability of Stau1⁵⁵ to act at the level of RNA metabolism. To address this possibility, TAR-CAT and CAT mRNAs were incubated in RRL in the presence or absence of Stau1⁵⁵Δ2-his₆. An inhibitor of translation (G418) was added to prevent mRNA association/protection with translating ribosomes. Aliquots were taken at different time points and RT-PCR amplifications were carried out using primers in the CAT sequence. The presence of Stau1⁵⁵Δ2-his₆, or that of

BSA as control, did not affect TAR-CAT (Fig. 6A) or CAT (not shown) mRNA stability, indicating that the RNA is as stable as in control conditions.

Similarly, we tested whether the steady state levels of TAR-Rluc and Rluc mRNAs in HEK293T cells varied with overexpression of Stau1⁵⁵-HA₃. TAR-Rluc or Rluc expressing plasmids were co-transfected with increasing concentrations of Stau1⁵⁵-HA₃ cDNAs. Twenty-four hours post-transfection, total RNA was extracted and semi-quantitative RT-PCR assays were performed using primers in the Rluc sequence. mRNA levels were normalized to endogenous *gapdh* mRNA. Expression of Stau1⁵⁵-HA₃ did not affect the steady state levels of TAR-Rluc and Rluc mRNAs (Fig. 6B). Luciferase assays performed on the same cell extracts showed the expected increase in translation of TAR-Rluc RNA (not shown).

Stau1⁵⁵ could potentially unwind the double-stranded TAR-RNA structure upon binding and facilitate translation. To test this possibility, recombinant Stau1⁵⁵Δ2-his₆ or the RNA-binding protein La-his₆ (43), used as a positive control (Figure 6C, left panel), were incubated in the presence of [³²P]labelled dsRNA and different combinations of NTP. As shown in figure 6C (right panel), a helicase activity was observed with the La autoantigen but could not be detected in the Stau1⁵⁵Δ2-his₆ preparation. These results show that Stau1⁵⁵Δ2-his₆ does not have helicase activity in vitro. These results suggest that Stau1 likely acts on the translational machinery to enhance structured RNA translation.

The Stau1⁵⁵ mutants that are unable to increase translation cofractionate with polysomes -

Since Stau1⁵⁵ associates with ribosomes (19;26), it might facilitate the positioning of the TAR-bearing transcript on the ribosomes and/or directly modulate ribosome activity. Therefore, one reason that Stau1⁵⁵ mutants failed to increase translation (Fig. 5D) might be because the

introduced mutations impaired their capacity to associate with ribosomes. To test this possibility, HEK293T cells were transfected with plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA₃ or Stau1⁵⁵-HA₃ mutants and treated with cycloheximide. Cell extracts were centrifuged on a continuous 10-40% sucrose density gradient to separate free ribosomes from polysomes. As seen in Figure 7A, Stau1⁵⁵-HA₃, Stau1^{55F}-HA₃ and Stau1^{55KK}-HA₃ were mainly found in fractions containing polysomes, showing that the mutations did not impair the capacity of the mutants to cosediment with ribosomes.

We next determined whether ribosomes that are associated with the Stau1⁵⁵ mutants have impaired translational capability, for example by forming non-translating polysomes. To explore this possibility, centrifugation experiments were repeated following treatment with sodium azide, a non-specific inhibitor of translation initiation (51). In this assay, mRNA-bound ribosomes are able to complete translation of the bound RNA but free ribosomes are unable to initiate translation. As a result, large polysomes disappear and the amounts of free ribosomes or ribosomal subunits increase. Following sodium azide treatment, large amounts of both Stau1⁵⁵-HA₃ and Stau1⁵⁵-HA₃ mutants were shifted from fractions containing heavy polysomes to fractions of monosomes and small polysomes (Fig. 7B). Quantitation of the amounts of Stau1⁵⁵-HA₃, Stau1^{55F}-HA₃ and Stau1^{55KK}-HA₃ in the presence or absence of sodium azide revealed a reduction of 54.0%, 54.4% and 58.8%, respectively, in the association with heavy polysomes. These results demonstrate that the mutations did not impair the capacity of the mutated Stau1⁵⁵ proteins to bind actively translating polysomes. Although we do not exclude the possibility that the mutations prevent association with essential translation factors, these results suggest that Stau1 acts as a carrier to facilitate transport/positioning of target RNAs on translating ribosomes.

Stau1⁵⁵ overexpression causes a shift of TAR-containing transcripts to dense polysomes –

In order to determine how Stau1 was influencing the TAR-Rluc RNA profile in polysomes, cells were transfected with plasmids expressing TAR-Rluc or Rluc, in the absence or presence of plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA₃. In the absence of Stau1⁵⁵-HA₃, the TAR-Rluc RNA was mostly found in fractions corresponding to 80S ribosomes and light polysomes that contain few ribosomes (Fig. 8A). However, in the presence of Stau1⁵⁵-HA₃, the TAR-Rluc RNA was shifted to heavy polysome fractions. In contrast, the Rluc RNA was found in heavy polysome fractions, in both the presence and absence of co-transfected Stau1⁵⁵-HA₃ (Fig. 8B). Interestingly, in the presence of Stau1⁵⁵-HA₃, the percentage of TAR-Rluc RNA in heavy polysome fractions was roughly the same as that of Rluc RNA in the presence or absence of Stau1⁵⁵-HA₃, consistent with the synthesis of similar amounts of Rluc protein (see above). These results suggest that Stau1⁵⁵ increases the probability to initiate TAR-Rluc RNA translation, thus increasing the number of attached ribosomes to form heavier polysomes and enhancing the global rate of translation of this transcript.

Stau1 increases translation of structure-repressed transcripts when tethered at the 5'end –

To establish a correlation between Stau1 binding to the 5'end of transcripts and its ability to enhance translation, we substituted the TAR-RNA structure with other structured RNA sequences. The Stau1-binding site (SBS) that was recently identified by us (52) or two copies of the MS2 binding site (MS2bs) were fused to the 5'end of the Rluc transcript (Fig. 9A). First, HEK293T cells were co-transfected with a fixed amount of either Rluc or SBS-Rluc cDNA and increasing amounts of cDNA coding for Stau1⁵⁵-HA₃. As seen in Figure 9B, Stau1⁵⁵-HA₃

stimulated translation of SBS-Rluc RNA about 5-fold as compared to SBS-Rluc RNA translation in the absence of transfected Stau1⁵⁵-HA₃. This effect was at the translational level because the SBS-Rluc transcript did not vary with Stau1⁵⁵-HA₃ expression (Fig. 9C). Similarly, cells were co-transfected with a fixed amount of the MS2bs-Rluc plasmid and increasing concentrations of MS2-Stau1⁵⁵-HA₃ or MS2-HA₃ as a negative control. MS2-Stau1⁵⁵-HA₃ increased translation about 3-fold as compared to MS2-HA₃ (Fig. 9D) showing that the effect is specific to Staufen1. Importantly, co-transfection of Stau1⁵⁵-HA₃ (instead of MS2-Stau1⁵⁵-HA₃) did not increase translation of the MS2-Rluc transcript (Fig. 9D) showing that Stau1⁵⁵ recruitment to the structured 5' end of RNA is critical for increased translation of these RNAs.

3.1.6. Discussion

DISCUSSION

In this paper, we show that Stau1⁵⁵ increases translation of mRNAs when bound to their 5' end. Consequently, Stau1⁵⁵ is not a general regulator of translation but rather acts on specific mRNA targets, through direct binding to their 5' end. Indeed, our data establish a significant correlation between the binding of Stau1⁵⁵ to the 5' end of a transcript and its ability to enhance translation. Interestingly, a maximal increase of expression was observed when a natural Stau1-binding site (52) was fused at the 5' end of *Rluc*. The Stau1⁵⁵-mediated up-regulation of translation is of the same order of magnitude as those reported for TRBP on TAR-bearing RNAs (41) and for proteins of the exon-junction complex on MS2-containing RNAs (53). Physiologically relevant transcripts harbouring structured 5' end are likely to be translationally repressed in the cells due to the translational block imposed by these structures (15;16). Therefore, their regulated interaction with Stau1⁵⁵ would allow a concerted expression of a specific set of Stau1⁵⁵-bound transcripts in response to cell's needs (see also below).

Other RNA-binding proteins have been shown to bind the TAR RNA structure and affect translation of TAR-bearing transcripts. Since both TRBP (34;41) and La autoantigen (42) were shown to increase translation of TAR-bearing RNA, as does Stau1⁵⁵, an indirect mechanism of translational repression involving competition between these proteins for the TAR RNA structure can be excluded. Inhibition of their function through competition should rather repress translation of TAR-bearing transcripts. In contrast, PKR activation through RNA binding was shown to repress translation (15;40). Therefore, binding of Stau1⁵⁵ to the TAR RNA structure may mask the PKR binding site, preventing PKR activation and indirectly enhancing general translation. However, even if the Stau1⁵⁵ binding site on TAR partly overlaps that of PKR (33),

we show that the Stau1⁵⁵-mediated increase in translation of TAR-bearing RNA is independent of PKR both in vitro and in cell cultures (Fig. 3). Nevertheless, a mechanism of competition between Stau1⁵⁵ and PKR for binding RNAs or sequestration of PKR through direct binding to Stau1⁵⁵ may explain the slight increase in the translation of CAT transcripts in vitro. This small increase was not seen in cultured cells, however.

Stau1-mediated upregulation of protein expression occurs at the translational level. Steady-state analyses of RNAs show that Stau1⁵⁵ does not protect TAR-transcripts from degradation and does not increase transcription. Moreover, Stau1⁵⁵ does not unwind dsRNA through helicase activity at least in vitro (Fig. 6). Therefore, although Stau1⁵⁵ RNA-binding activity is required, Stau1⁵⁵ has no observable effect on RNA metabolism. It was suggested that the secondary structure of TAR affects translation by preventing the accessibility of the cap structure (29). In this context, Stau1⁵⁵ may favour access of this highly structured RNA to the ribosomal and/or translational machinery. Binding of Stau1⁵⁵ to TAR-bearing transcripts may 1) facilitate transport and positioning of the transcripts on the ribosomes, 2) destabilize the TAR RNA structure, allowing binding of eIF4E and/or 3) facilitate interaction between co-factors, the TAR structure and the ribosomes. Therefore, our working hypothesis is that Stau1⁵⁵ first binds selected RNA and facilitates their transport and positioning on the ribosomes through its capacity to associate with ribosomes. Then, Stau1⁵⁵ and/or Stau1⁵⁵-associated proteins may help to destabilize the 5' end structure leading to better interaction with translation initiation factors like eIF4E and/or the translational machinery. This effect would allow more ribosomes to be bound to the transcript (Fig. 8) and consequently should increase translation. While it would be interesting to test if direct binding of Stau1⁵⁵ to ribosomes is required for its function on

translation, all of the Stau1 mutations tested to date that prevent Stau1⁵⁵-ribosome association also impair Stau1⁵⁵ RNA-binding activity (26).

Alternatively, Stau1⁵⁵ through its observed association with the 60S ribosomal subunit (26) may directly modify ribosomal activity, favouring the joining of the 60S ribosomal subunit to the translation initiation complex and/or influencing translational elongation. Stau1⁵⁵ may also interact with chaperones that facilitate proper folding of nascent proteins thus increasing the translation elongation rate or it may interfere with the association of trans-acting protein repressors to 3' or 5'UTR of RNA. The former hypothesis is not likely since the same protein is translated from TAR-Rluc and Rluc transcripts. In *Drosophila*, translational repression of *oskar* mRNA depends on functional association of proteins that bind both its 3' and 5'UTR (10;54-56) and on protein involved in the stabilization of the nascent protein (57). Interestingly, the 5'UTR of *oskar* mRNA contains an RNA sequence/element that is required for its translational de-repression when localized at the posterior pole (54).

What is the biological relevance of Stau1 in translational regulation? Proteomic (25;27;28;58) and cell biology (21-24;59) experiments clearly establish that Stau1 is a component of RNA granules in several cell types. In neurons, Stau1 granules also contain RNAs and move in dendrites on microtubules (23;24) suggesting that Stau1 function might be linked to mRNA transport. This conclusion is supported by the observation that the down-regulation of Stau1 by siRNA reduces the amounts of RNA in dendrites of neurons (25). While the exact role of Stau1 has yet to be defined, it is clear that Stau1⁵⁵ plays multiple role(s) in cells in addition to its role in RNA transport. Stau1⁵⁵ is associated with telomerase and/or telomeric RNA in the nucleolus (60;61), suggesting that it has nuclear function. In the cytoplasm, Stau1⁵⁵ regulates RNA stability (52) and it can also regulate translation of a subpopulation of transcripts (this

manuscript). These functions may all be complementary to its putative role in RNA transport such that in both RNA transport granules and stress granules, translation is known to be repressed (62-64) and it must resume once the transcripts are localized or when physiological conditions are returned to normal. Stau1⁵⁵ is likely associated to RNA during transport and to translation following localization as demonstrated for Staufen in *Drosophila* (10). Since the 5'-SBS-bearing transcripts are translationally repressed, a five-fold increase in their translation following Stau1⁵⁵ binding is functionally significant. Several Stau1⁵⁵-bound transcripts code for proteins involved in the cell metabolism and/or cell growth (52) making critical the regulation of their translation. The site of Stau1⁵⁵ binding on the RNA may determine the nature of the induced process. When bound downstream of a natural termination codon, Stau1⁵⁵ elicits RNA degradation (52) whereas its binding to the 5'UTR of a transcript enhances translation but not RNA degradation. Similar observations were reported for the proteins of the exon-junction complex that can either induce non-sense mediated RNA decay or enhance translation (53). Stau1⁵⁵ post-translational modifications and/or its association with different co-factors may regulate these processes, in response to the cell's needs, for instance. These results indicate that Stau1 is a multifunctional protein. Analyses of Stau1⁵⁵-endogenous RNA ligands will contribute to elucidate these mechanisms.

3.1.7. Reference List

Reference List

1. Kiebler, M.A. and DesGroseillers, L. (2000) Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron*, **25**, 19-28.
2. Chartrand, P., Singer, R.H. and Long, R.M. (2001) RNP localization and transport in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**, 297-310.
3. Johnstone, O. and Lasko, P. (2001) Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu. Rev. Genet.*, **35**, 365-406.
4. Kislauskis, E.H., Zhu, X. and Singer, R.H. (1994) Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J. Cell Biol.*, **127**, 441-451.
5. Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S.M., Singer, R.H. and Long, R.M. (1998) Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell*, **2**, 437-445.
6. Li, P., Yang, X., Wasser, M., Cai, Y. and Chia, W. (1997) Inscuteable and Staufien mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell*, **90**, 437-447.
7. Steward, O. and Schuman, E.M. (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 299-325.
8. Steward, O. and Worley, P.F. (2001) A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 7062-7068.
9. Chartrand, P., Meng, X.H., Huttelmaier, S., Donato, D. and Singer, R.H. (2002) Asymmetric sorting of ash1p in yeast results from inhibition of translation by localization elements in the mRNA. *Mol. Cell*, **10**, 1319-1330.
10. Kim-Ha, J., Kerr, K. and Macdonald, P.M. (1995) Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell*, **81**, 403-412.
11. Gavis, E.R. and Lehmann, R. (1994) Translational regulation of nanos by RNA localization. *Nature*, **369**, 315-318.
12. Rongo, C., Gavis, E.R. and Lehmann, R. (1995) Localization of oskar RNA regulates oskar translation and requires Oskar protein. *Development*, **121**, 2737-2746.
13. Huang, Y.S. and Richter, J.D. (2004) Regulation of local mRNA translation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 308-313.
14. Huang, Y.S., Carson, J.H., Barbarese, E. and Richter, J.D. (2003) Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes Dev.*, **17**, 638-653.

15. Edery,I., Petryshyn,R. and Sonenberg,N. (1989) Activation of double-stranded RNA-dependent kinase (dsl) by the TAR region of HIV-1 mRNA: a novel translational control mechanism. *Cell*, **56**, 303-312.
16. Goossen,B. and Hentze,M.W. (1992) Position is the critical determinant for function of iron-responsive elements as translational regulators. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 1959-1966.
17. St Johnston,D., Beuchle,D. and Nusslein-Volhard,C. (1991) Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell*, **66**, 51-63.
18. Micklem,D.R., Adams,J., Grunert,S. and St Johnston,D. (2000) Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J.*, **19**, 1366-1377.
19. Marion,R.M., Fortes,P., Beloso,A., Dotti,C. and Ortin,J. (1999) A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 2212-2219.
20. Wickham,L., Duchaine,T., Luo,M., Nabi,I.R. and DesGroseillers,L. (1999) Mammalian staufer is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 2220-2230.
21. Mallardo,M., Deitinghoff,A., Muller,J., Goetze,B., Macchi,P., Peters,C. and Kiebler,M.A. (2003) Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **100**, 2100-2105.
22. Krichevsky,A.M. and Kosik,K.S. (2001) Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron*, **32**, 683-696.
23. Kiebler,M.A., Hemraj,I., Verkade,P., Kohrmann,M., Fortes,P., Marion,R.M., Ortin,J. and Dotti,C.G. (1999) The mammalian staufer protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J.Neurosci.*, **19**, 288-297.
24. Kohrmann,M., Luo,M., Kaether,C., DesGroseillers,L., Dotti,C.G. and Kiebler,M.A. (1999) Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol.Biol.Cell*, **10**, 2945-2953.
25. Kanai,Y., Dohmae,N. and Hirokawa,N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, **43**, 513-525.
26. Luo,M., Duchaine,T.F. and DesGroseillers,L. (2002) Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem.J.*, **365**, 817-824.
27. Villace,P., Marion,R.M. and Ortin,J. (2004) The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2411-2420.

28. Brendel,C., Rehbein,M., Kreienkamp,H.J., Buck,F., Richter,D. and Kindler,S. (2004) Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem.J.*, **384**, 239-246.
29. Parkin,N.T., Cohen,E.A., Darveau,A., Rosen,C., Haseltine,W. and Sonenberg,N. (1988) Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type 1: effects of secondary structure on translation. *EMBO J.*, **7**, 2831-2837.
30. Maitra,R.K., McMillan,N.A., Desai,S., McSwiggen,J., Hovanessian,A.G., Sen,G., Williams,B.R. and Silverman,R.H. (1994) HIV-1 TAR RNA has an intrinsic ability to activate interferon-inducible enzymes. *Virology*, **204**, 823-827.
31. Sengupta,D.N. and Silverman,R.H. (1989) Activation of interferon-regulated, dsRNA-dependent enzymes by human immunodeficiency virus-1 leader RNA. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 969-978.
32. Berkhout,B., Silverman,R.H. and Jeang,K.T. (1989) Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell*, **59**, 273-282.
33. Spanggord,R.J., Vuyisich,M. and Beal,P.A. (2002) Identification of binding sites for both dsRBMs of PKR on kinase-activating and kinase-inhibiting RNA ligands. *Biochemistry*, **41**, 4511-4520.
34. Gatignol,A., Buckler-White,A., Berkhout,B. and Jeang,K.T. (1991) Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science*, **251**, 1597-1600.
35. Fujii,R., Okamoto,M., Aratani,S., Oishi,T., Ohshima,T., Taira,K., Baba,M., Fukamizu,A. and Nakajima,T. (2001) A Role of RNA Helicase A in cis-Acting Transactivation Response Element-mediated Transcriptional Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J.Biol.Chem.*, **276**, 5445-5451.
36. Chang,Y.N., Kenan,D.J., Keene,J.D., Gatignol,A. and Jeang,K.T. (1994) Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *J.Virol.*, **68**, 7008-7020.
37. Der,S.D. and Lau,A.S. (1995) Involvement of the double-stranded-RNA-dependent kinase PKR in interferon expression and interferon-mediated antiviral activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **92**, 8841-8845.
38. Hershey,J.W. (1989) Protein phosphorylation controls translation rates. *J.Biol.Chem.*, **264**, 20823-20826.
39. Hershey,J.W. (1991) Translational control in mammalian cells. *Annu.Rev.Biochem.*, **60**, 717-755.
40. Lee,S.B., Melkova,Z., Yan,W., Williams,B.R., Hovanessian,A.G. and Esteban,M. (1993) The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase potentially inhibits protein synthesis in cultured cells. *Virology*, **192**, 380-385.

41. Dorin,D., Bonnet,M.C., Bannwarth,S., Gatignol,A., Meurs,E.F. and Vaquero,C. (2003) The TAR RNA-binding protein, TRBP, stimulates the expression of TAR-containing RNAs in vitro and in vivo independently of its ability to inhibit the dsRNA-dependent kinase PKR. *J.Biol.Chem.*, **278**, 4440-4448.
42. Svitkin,Y.V., Pause,A. and Sonenberg,N. (1994) La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J.Virol.*, **68**, 7001-7007.
43. Huhn,P., Pruijn,G.J., van Venrooij,W.J. and Bachmann,M. (1997) Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 410-416.
44. Crine,P., LeGrimellec,C., Lemieux,E., Labonte,L., Fortin,S., Blachier,A. and Aubry,M. (1985) The production and characterization of a monoclonal antibody specific for the 94,000 dalton enkephalin-degrading peptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **131**, 255-261.
45. Duchaine,T., Wang,H.J., Luo,M., Steinberg,S.V., Nabi,I.R. and DesGroseillers,L. (2000) A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Mol.Cell Biol.*, **20**, 5592-5601.
46. Paddison,P.J., Caudy,A.A., Sachidanandam,R. and Hannon,G.J. (2004) Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells. *Methods Mol.Biol.*, **265**, 85-100.
47. Geballe,A.P. and Gray,M.K. (1992) Variable inhibition of cell-free translation by HIV-1 transcript leader sequences. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4291-4297.
48. Huang,J.T. and Schneider,R.J. (1990) Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis is prevented by the drug 2-aminopurine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **87**, 7115-7119.
49. Sengupta,D.N., Berkhout,B., Gatignol,A., Zhou,A.M. and Silverman,R.H. (1990) Direct evidence for translational regulation by leader RNA and Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **87**, 7492-7496.
50. Yang,Y.L., Reis,L.F., Pavlovic,J., Aguzzi,A., Schafer,R., Kumar,A., Williams,B.R., Aguet,M. and Weissmann,C. (1995) Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *EMBO J.*, **14**, 6095-6106.
51. Feng,Y., Absher,D., Eberhart,D.E., Brown,V., Malter,H.E. and Warren,S.T. (1997) FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol. Cell*, **1**, 109-118.
52. Kim,Y.K., Furic,L., DesGroseillers,L. and Maquat,L.E. (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell*, **120**, 195-208.
53. Nott,A., Le Hir,H. and Moore,M.J. (2004) Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev.*, **18**, 210-222.

54. Gunkel,N., Yano,T., Markussen,F.H., Olsen,L.C. and Ephrussi,A. (1998) Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of *oskar* mRNA. *Genes Dev.*, **12**, 1652-1664.
55. Wilhelm,J.E., Hilton,M., Amos,Q. and Henzel,W.J. (2003) Cup is an eIF4E binding protein required for both the translational repression of *oskar* and the recruitment of Barentsz. *J.Cell Biol.*, **163**, 1197-1204.
56. Yano,T., De Quinto,S.L., Matsui,Y., Shevchenko,A., Shevchenko,A. and Ephrussi,A. (2004) Hrp48, a Drosophila hnRNPA/B Homolog, Binds and Regulates Translation of *oskar* mRNA. *Dev.Cell*, **6**, 637-648.
57. Braat,A.K., Yan,N., Arn,E., Harrison,D. and Macdonald,P.M. (2004) Localization-dependent *oskar* protein accumulation; control after the initiation of translation. *Dev.Cell*, **7**, 125-131.
58. Ohashi,S., Koike,K., Omori,A., Ichinose,S., Ohara,S., Kobayashi,S., Sato,T.A. and Anzai,K. (2002) Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J.Biol.Chem.*, **277**, 37804-37810.
59. Thomas,M.G., Tosar,L.J., Loschi,M., Pasquini,J.M., Correale,J., Kindler,S. and Boccaccio,G.L. (2005) Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol.Biol.Cell*, **16**, 405-420.
60. Bachand,F., Triki,I. and Autexier,C. (2001) Human telomerase RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3385-93.
61. Le,S., Sternglanz,R. and Greider,C.W. (2000) Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol Biol Cell*, **11**, 999-1010.
62. Kedersha,N. and Anderson,P. (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem.Soc.Trans.*, **30**, 963-969.
63. Darnell,R.B. (2002) RNA logic in time and space. *Cell*, **110**, 545-550.
64. Wickens,M. and Goldstrohm,A. (2003) Molecular biology. A place to die, a place to sleep. *Science*, **300**, 753-755.

3.1.8. Acknowledgements

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank M. Fyfe for her help in the production of monoclonal antibody, L. Cournoyer for help in cell cultures and T.-S. Huang for bacterially expressed Stau1 preparation. We thank A. Gagnon (McGill University) for the PKR^{-/-} cell line, E. Cohen (University of Montreal) for the SpIII-10 CAT and pSp64TAR-CAT plasmids, K.T. Jeang (NIH/NIAID Bethesda, MD) for the p48, p49 and La-pBS SK plasmids, L.E. Maquat (Rochester University) for MS2-HA and MS2-Stau1-HA plasmids, P. Chartrand (University of Montreal) for the pSL-MS2 plasmid and G. Ferbeyre (University of Montreal) for the pGEM-U6 plasmid. This work was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant to LDG and a Canadian Institute for Health Research (CIHR) grant to AJM. AJM was supported by a CIHR New Investigator Award. KB and SDB were supported by studentships from NSERC and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), respectively.

3.1.9. Figure legends

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Stau1⁵⁵-HA3 increases translation of TAR-bearing RNA in RRL. (A) Schematic representation of transcripts. RNAs coding for the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) reporter protein are shown with or without a double-stranded TAR RNA structure at the 5' end. (B) Translation of in vitro synthesized CAT and TAR-CAT transcripts in RRL. TAR structure at the 5' end of the transcript represses translation. Vertical arrow, RNA concentration (4 µg/ml) subsequently used in the in vitro translation assays. (C) Bacterially expressed NEP-his₆ (NEP) and Stau1⁵⁵Δ2-his₆ (Stau) were purified on Ni-NTA columns, analyzed by SDS-PAGE and coomassie blue staining. Wildtype Stau1⁵⁵ and the truncated Stau1⁵⁵Δ2-his₆ are schematically represented. Black boxes, full length double-stranded RNA-binding domains (dsRBD) 3 and 4; white boxes, half size dsRBD 2 and 5; hatched box, the tubulin binding domain (TBD). (D) Bacterially expressed and purified Stau1⁵⁵Δ2-his₆ was added (+) to RRL in the presence (+) or absence (-) of TAR-CAT RNA. Extracts were centrifuged and proteins in the pellet were analyzed by SDS-PAGE. Proteins were revealed with anti-Stau1 and anti-ribosomal protein L7 antibodies. Endogenous Stau1 in RRL is visible at 55 kDa. I, input is 250 ng protein. (E) A representative experiment showing that Stau1⁵⁵Δ2-his₆ increases translation of TAR-CAT RNA in RRL. CAT or TAR-CAT RNAs (4 µg/ml) were incubated in RRL with increasing concentrations of bacterially purified Stau1⁵⁵Δ2-his₆ or NEP-his₆, in the presence of [³⁵S]methionine. Resulting proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Note that one fifth volume of CAT and one volume of TAR-CAT translation products were loaded on gel. (F) In this experiment, in vitro synthesized CAT was measured by ELISA (n = 4). Statistical

analyses of TAR-CAT and CAT RNA translation in relation to the concentration of Stau1⁵⁵Δ2-his₆.

Figure 2. Stau1⁵⁵-HA₃ increases translation of TAR-Rluc transcripts in HEK293T cells. (A) HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing either Rluc or TAR-Rluc transcripts and different concentrations of a plasmid coding for Stau1⁵⁵-HA₃. Resulting luciferase activity was quantified 24h post-transfection. Results are expressed as fold induction in luciferase activity *versus* the concentration of the Stau1⁵⁵-HA₃ coding plasmid. Fold induction of the luciferase activity in the absence of Stau1⁵⁵-HA₃ was defined as 1. **, $p \leq 0.01$. n = 3. (B) HEK293T cells were transfected with different concentrations of a plasmid coding for Stau1⁵⁵-HA₃. Western blot analyses showed that, for most dilutions, Stau1⁵⁵-HA₃ (60 kDa) is not overexpressed as compared to endogenous Stau1⁵⁵ (55 kDa). (C) Schematic representation of Stau1⁵⁵Δsh1-HA₃ and position of the sh1 and sh2 RNAs. Symbols are described in the legend of Fig. 1. (D) HEK293T cells were transfected with plasmids expressing sh1 or shsh2 RNAs (left panel) or co-transfected with plasmids expressing sh1 RNA and Stau1⁵⁵Δsh1-HA₃ (right panel). Proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using anti-Stau1 and anti-calnexin (Cnx) antibodies. The percentage of down regulation of endogenous Stau1⁵⁵ is indicated at the bottom of the figure. Position of endogenous Stau1⁶³ and of Stau1⁵⁵ is indicated by two and one asterix, respectively (E) HEK293T cells were transfected as described in (D) in the presence of either TAR-Rluc or Rluc expressors. Resulting luciferase activity was analyzed as described in (B). n = 3. Expression of sh1 decreased luciferase activity that is rescued by expression of Stau1⁵⁵Δsh1-HA₃. *, $p \leq 0.05$.

Figure 3. Stau1⁵⁵-mediated increase of TAR-bearing RNA translation is independent of PKR. (A) In vitro protein synthesis in RRL was done as described in Fig 1, except that PKR was inhibited by addition of the ser/thr kinase inhibitor 2-aminopurine (2-AP). The same volume of CAT and TAR-CAT translation products was loaded on gel. (B) Statistical analyses of TAR-CAT (left panel) and CAT (right panel) RNA translation in relation to the concentration of Stau1⁵⁵Δ2-his₆. In vitro synthesized CAT was measured by ELISA (n = 4). (C) PKR^{-/-} MEF cells were co-transfected with plasmids expressing either *Rluc* or TAR-*Rluc* transcripts and different concentrations of a plasmid coding for Stau1⁵⁵-HA₃. Resulting luciferase activity was measured as described in Fig. 2A. Fold induction of the luciferase activity in the absence of Stau1⁵⁵-HA₃ was defined as 1. *, p ≤ 0.05. n = 3.

Figure 4. Stau1⁵⁵Δ2-his₆ binds the TAR-RNA structure in vitro. (A) Filter binding assays using bacterially expressed and column-purified Stau1⁵⁵Δ2-his₆ and [³²P]labelled TAR or bicoid 3'UTR RNA (left panel). Similar experiments were performed with [³²P]labelled TAR mutants, allowing to calculate K_d (right panel). (B) Schematic representation of different mutants already used to map TAR-binding proteins (34). Position and nature of substituted nucleotides are indicated. (C) Northwestern assays using bacterially expressed and column-purified Stau1⁵⁵Δ2-his₆ and [³²P]labelled TAR and TAR mutants. The arrow indicates the position of Stau1⁵⁵Δ2-his₆. The upper band likely represents dimers.

Figure 5. The Stau1⁵⁵ RNA-binding activity is required for TAR-bearing RNA translational regulation. (A) Schematic representation of wild type Stau1⁵⁵-HA₃ and of two mutants with disrupted RNA-binding activity. Symbols are described in the legend of Fig. 1. (B)

HEK293T cells were transfected with plasmids coding for either Stau1⁵⁵-HA₃, Stau1^{55F}-HA₃ or Stau1^{55KK}-HA₃. Tagged proteins were immunoprecipitated with an anti-HA antibody and resulting proteins were analyzed by SDS-PAGE. Western blotting (upper panel) using anti-Stau1 antibody and Northwestern blotting (lower panel) using [³²P]labelled TAR RNA. Arrows indicate the position of Stau1-HA₃. *, non-specific IgG bands. (C) HEK293T cells were transfected with plasmids coding for either Stau1⁵⁵-HA₃, Stau1^{55F}-HA₃ or Stau1^{55KK}-HA₃ and proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using anti-Stau1 and anti-tubulin antibodies. Similar amounts of proteins are expressed by the three plasmids. (D) HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing either *Rluc* or *TAR-Rluc* transcripts and different concentrations of plasmids coding for either Stau1^{55F}-HA₃ (left panel) or Stau1^{55KK}-HA₃ (right panel). Resulting luciferase activity was quantified as described in Fig. 2B. Fold induction of the luciferase activity in the absence of Stau1⁵⁵-HA₃ was defined as 1. Differences are not statistically significant. n = 3.

Figure 6. Stau1⁵⁵-HA₃-mediated translational upregulation does not involved RNA modification. (A) TAR-CAT RNA was incubated in RRL in the presence of 400 nM of bacterially expressed and purified Stau1⁵⁵Δ2-his₆ or BSA for increasing periods of time. TAR-CAT RNA was then reverse transcribed and PCR-amplified for 14 cycles to stay in the non-saturated part of the amplification curve. Resulting DNA was resolved on agarose gel. As control, the same experiment was done in the absence of reverse transcriptase (right panel). (B) HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing either *Rluc* or *TAR-Rluc* transcripts and different concentrations of a plasmid coding for Stau1⁵⁵-HA₃. Twenty four hours post-transfection, RNA was isolated, reverse transcribed and PCR-amplified. Resulting DNA

was resolved on agarose gel. As control, the same experiment was done in the absence of reverse transcriptase (- RT). RNA coding for GAPDH was RT-PCR and used to normalize the results. (C) Bacterially expressed and column-purified Stau1⁵⁵Δ2-his₆ (Stau) and La-his₆ (La) (left panel) were incubated with [³²P]labeled double-stranded RNA in the presence of different combinations of ribonucleotides (right panel). RNA was resolved on agarose gel and revealed by autoradiography. While La-his₆ displayed an helicase activity, Stau1⁵⁵Δ2-his₆ was inactive in this assay.

Figure 7. Stau1⁵⁵ mutants unable to modulate TAR-Rluc translation are nevertheless associated with ribosomes. HEK293T cells were transfected with plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA₃, Stau1^{55F}-HA₃ or Stau1^{55KK}-HA₃. Cells were treated with either cyclohexemide (A) or sodium azide (B) for 20 and 30 minutes respectively before being lysed. Cell extracts were separated onto 10-40% sucrose gradients and proteins in each fraction were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using anti-HA and anti-ribosomal protein L7 antibodies. Positions of 40S, 60S ribosomal subunits, 80S ribosomes and polysomes are indicated as revealed by the OD₂₅₄ scan of the gradients.

Figure 8. In the presence of Stau1⁵⁵-HA₃, TAR-Rluc transcripts are shifted to fractions containing heavy polysomes. HEK293T cells were transfected with plasmids expressing either TAR-Rluc (A) or Rluc (B) transcripts (top panels) or co-transfected with the same plasmids and plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA₃ (bottom panels). Twenty four hours post-transfection, cell extracts were centrifuged onto 15-45% sucrose gradients and the position of ribosomal subunits, ribosomes and polysomes determined by OD₂₅₄ (not shown). Position of polysomes is indicated.

RNA was isolated from each fraction and analyzed by slot-blotting and hybridization using [^{32}P]labeled luciferase cDNA. As control, the probe recognized a single band on a Northern blot made with RNA isolated from Rluc-transfected HEK293T cells (not shown). The percentage of RNA in each fraction in relation to the amount of total RNA is plotted above the hybridization blots. The percentage of RNA found in heavy polysomes is indicated below the blots. Similar results were obtained 3 times. The increase in the amounts of TAR-Rluc transcripts associated with heavy polysomes in the presence of Stau1⁵⁵-HA₃ is statistically significant ($p \leq 0.05$) whereas the small decrease in the amounts of Rluc transcripts associated with heavy polysomes in the presence of Stau1⁵⁵-HA₃ is not statistically significant.

Figure 9. Binding of Stau1⁵⁵ to the 5'end increases translation of structure-repressed transcripts. (A) Schematic representation of 5'-structure-repressed transcripts. RNAs coding for the Rluc reporter protein are shown with one copy of the Staufen1-binding site (SBS) or two copies of the MS2-binding site (MS2bs) at the 5'end. (B) HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing either Rluc or SBS-Rluc transcripts and different concentrations of a plasmid coding for Stau1⁵⁵-HA₃. Resulting luciferase activity was quantified 24h post-transfection. Results are expressed as luciferase activity vs concentration of the Stau1⁵⁵-HA₃ coding plasmid. The luciferase activity in the absence of Stau1⁵⁵-HA₃ was defined as 1. $p \leq 0.01$. $n = 3$. (C) HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing the SBS-Rluc transcript and different concentrations of a plasmid coding for Stau1⁵⁵-HA₃. Twenty four hours post-transfection, RNA was isolated, reverse transcribed and PCR-amplified. Resulting DNA was resolved on agarose gel. As control, the same experiment was done in the absence of reverse transcriptase (- RT). RNA coding for GAPDH was RT-PCR and used to normalize the results.

(D) HEK293T cells were co-transfected with plasmids expressing the MS2bs-Rluc transcript and different concentrations of plasmids coding for either MS2-Stau1⁵⁵-HA₃, MS2-HA or Stau1⁵⁵-HA₃. Resulting luciferase activity was quantified 24h post-transfection. The luciferase activity in the absence of expressor plasmids was defined as 1. n = 3.

3.1.10. Tables and Figures

TABLE I

Oligonucleotides used to mutate the TAR sequence

TAR mutant	Oligonucleotide sequence
pAB	5' - CTCTGGCTAACTAGGGAACCCG - 3' 3' - TCGAGAGACCGATTGATCCCTTGGGCCTAG - 5'
pCD	5' - GATCTGAGCCC <u>AAA</u> AGCT - 3' 3' - ACTCGGG <u>TTT</u> - 5'
pEF	5' - AGCTTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTG <u>TCG</u> CTGGGAGCT - 3' 3' - ACCCAGAGAGACCAATCTGGTCTAGAC <u>AGCG</u> ACCC - 5'
pGH	5' - AGCTTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGA <u> </u> GAGCCTGGGAGCT - 3' 3' - ACCCAGAGAGACCAATCTGGTCT <u> </u> CTCGGACCC - 5'
pIJ	5' - AGCTTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGAA <u>AGG</u> AGCCTGGGAGCT - 3' 3' - ACCCAGAGAGACCAATCTGGTCT <u>TTC</u> CTCGGACCC - 5'

Figure 1

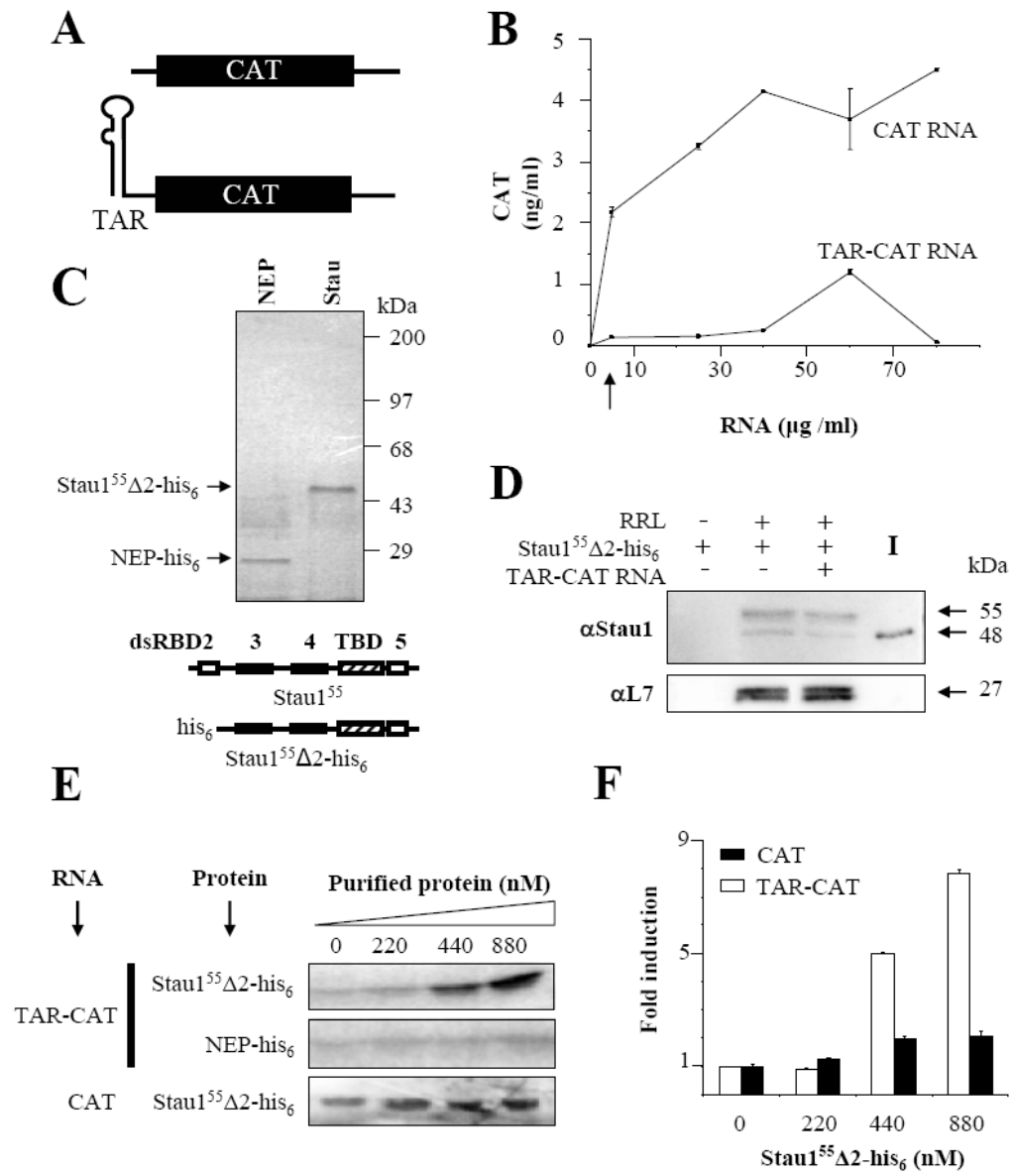


Figure 2

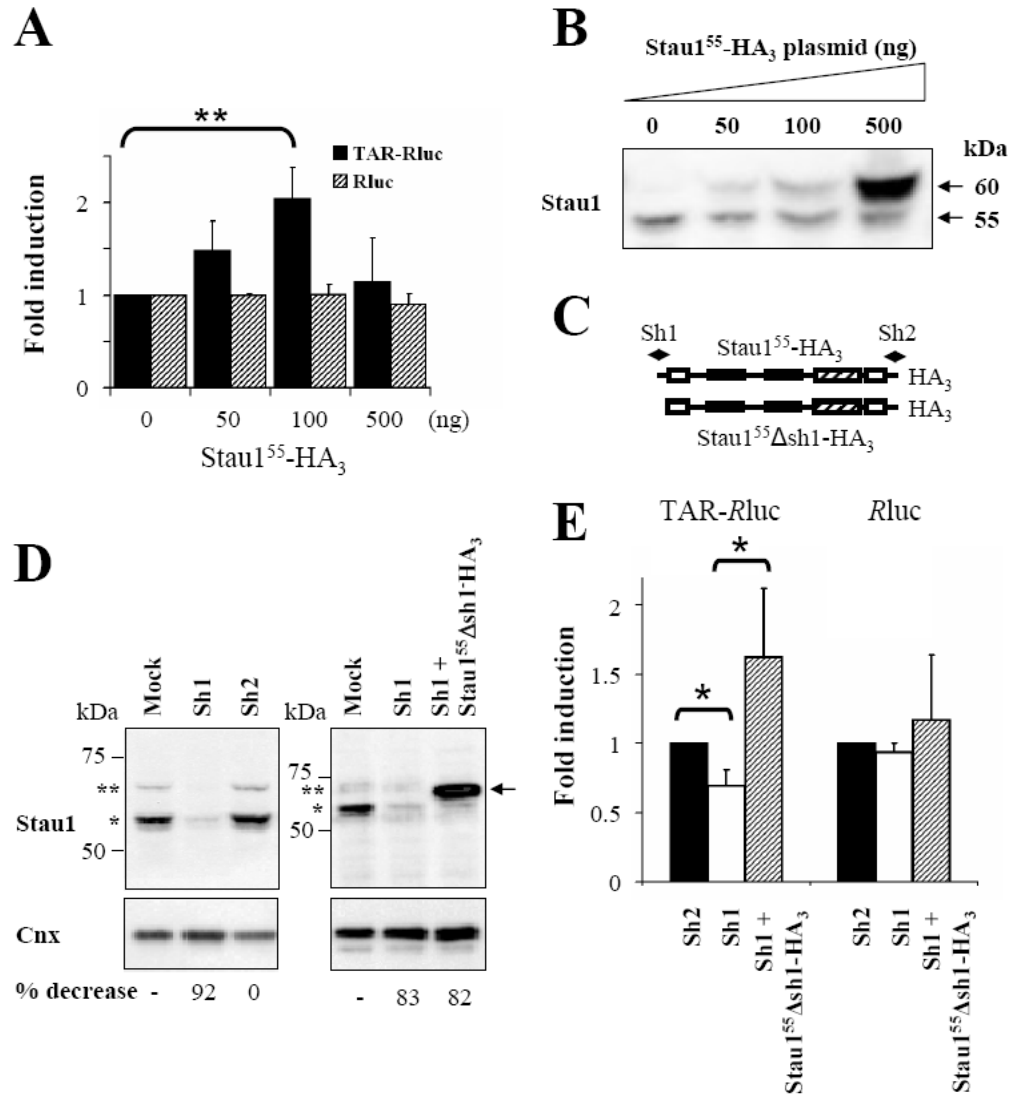


Figure 3

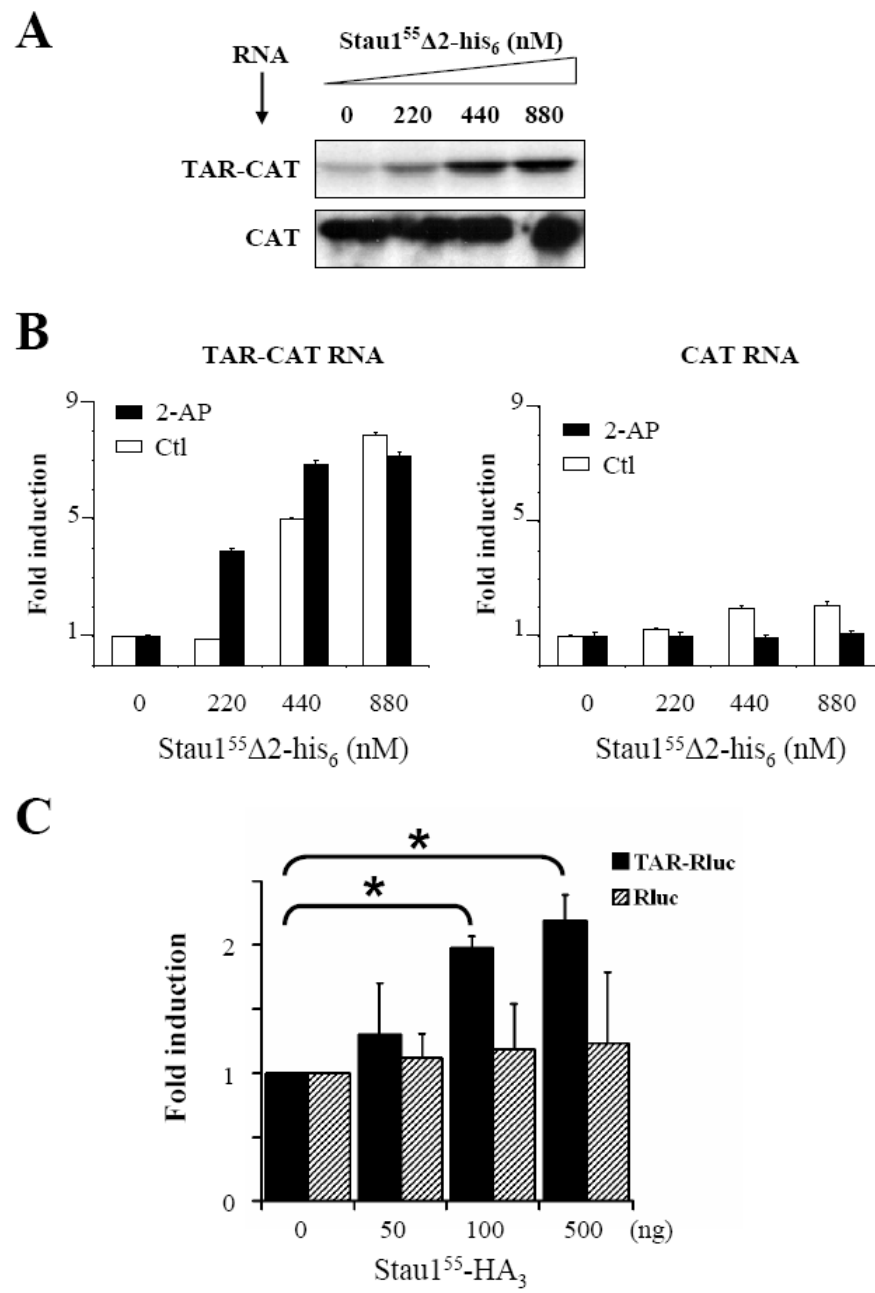


Figure 4

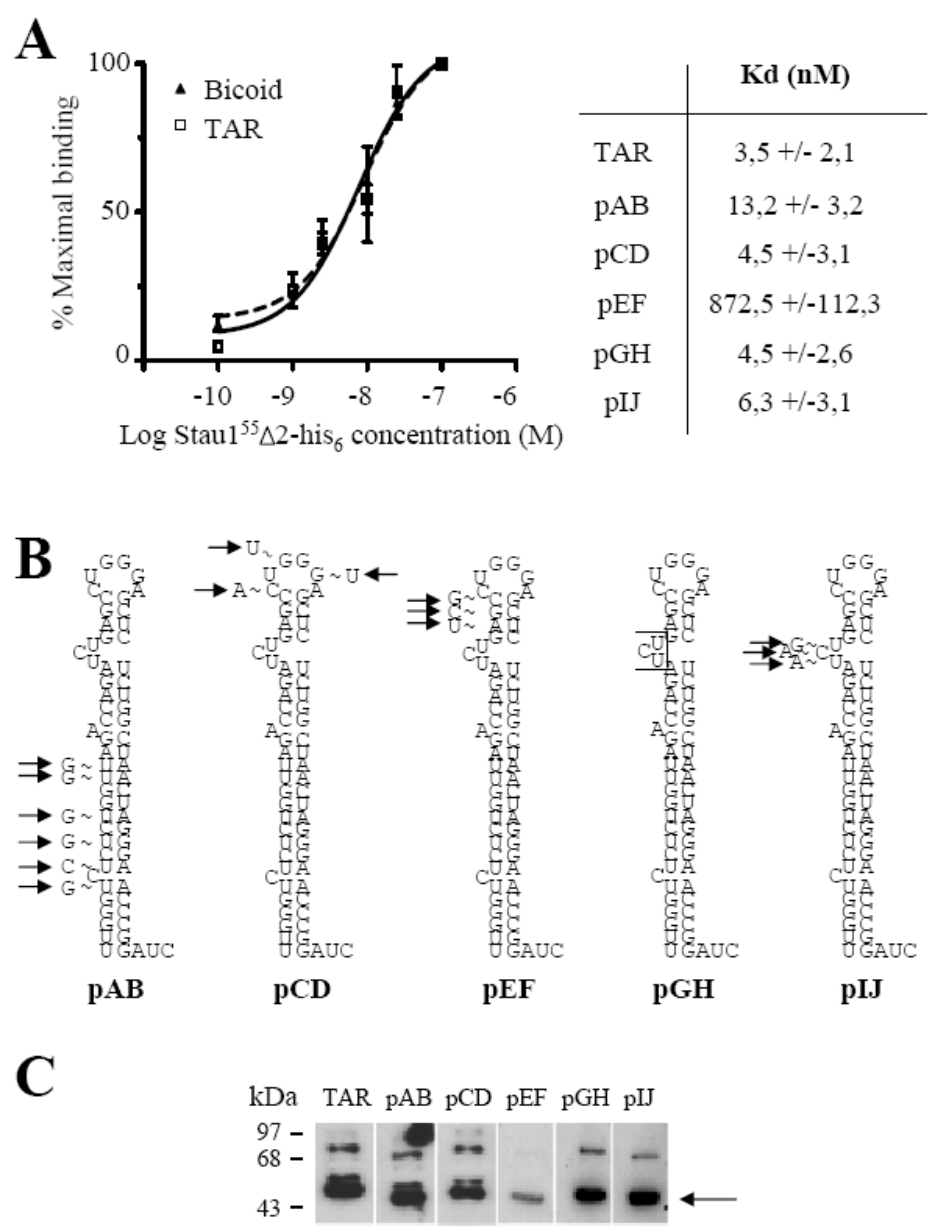


Figure 5

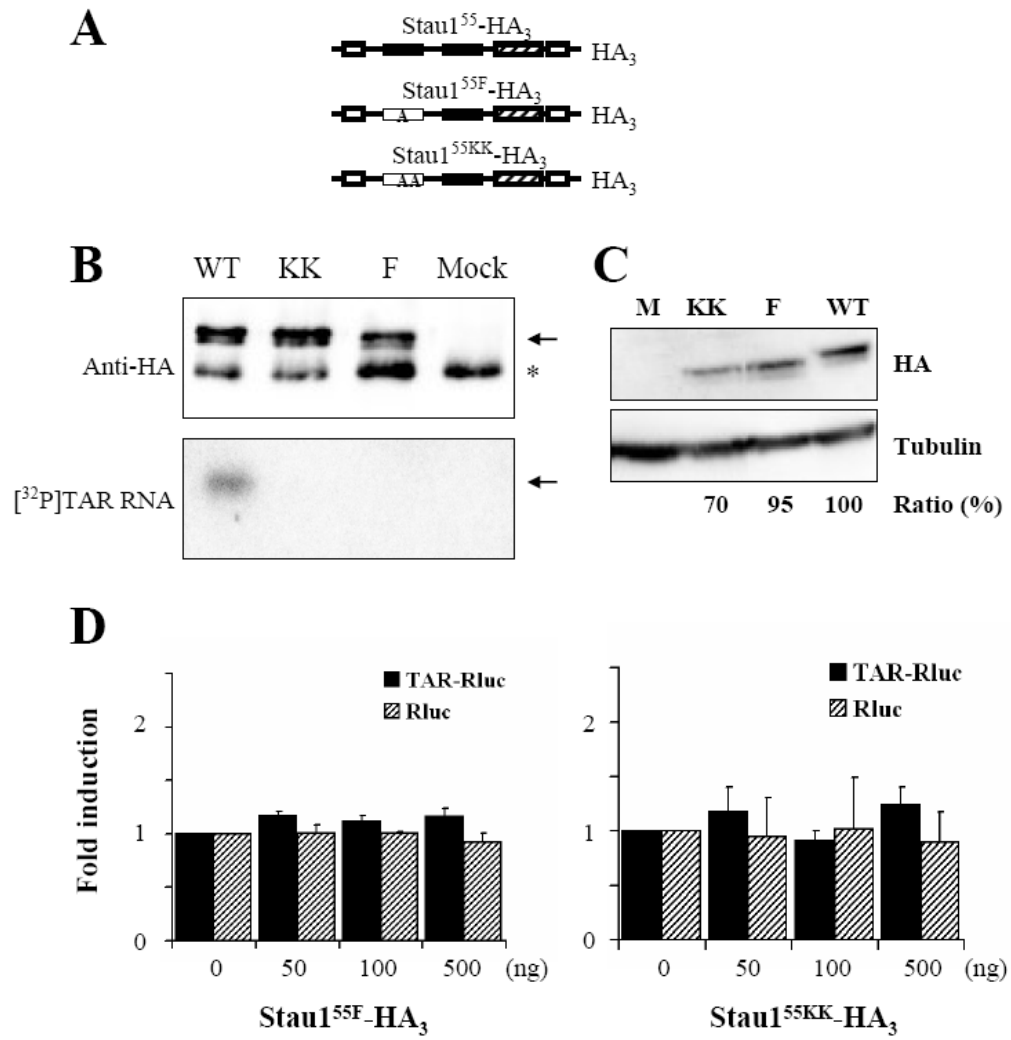


Figure 6

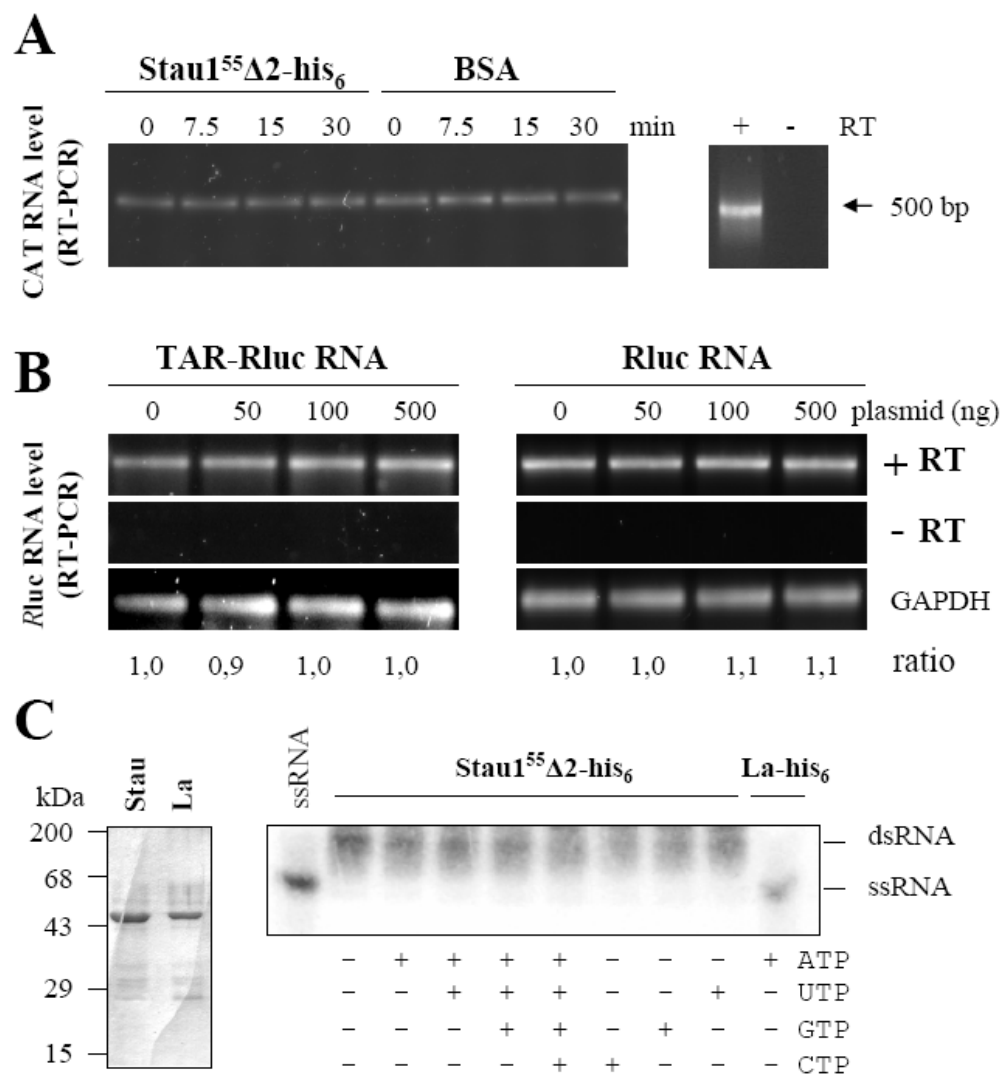


Figure 7

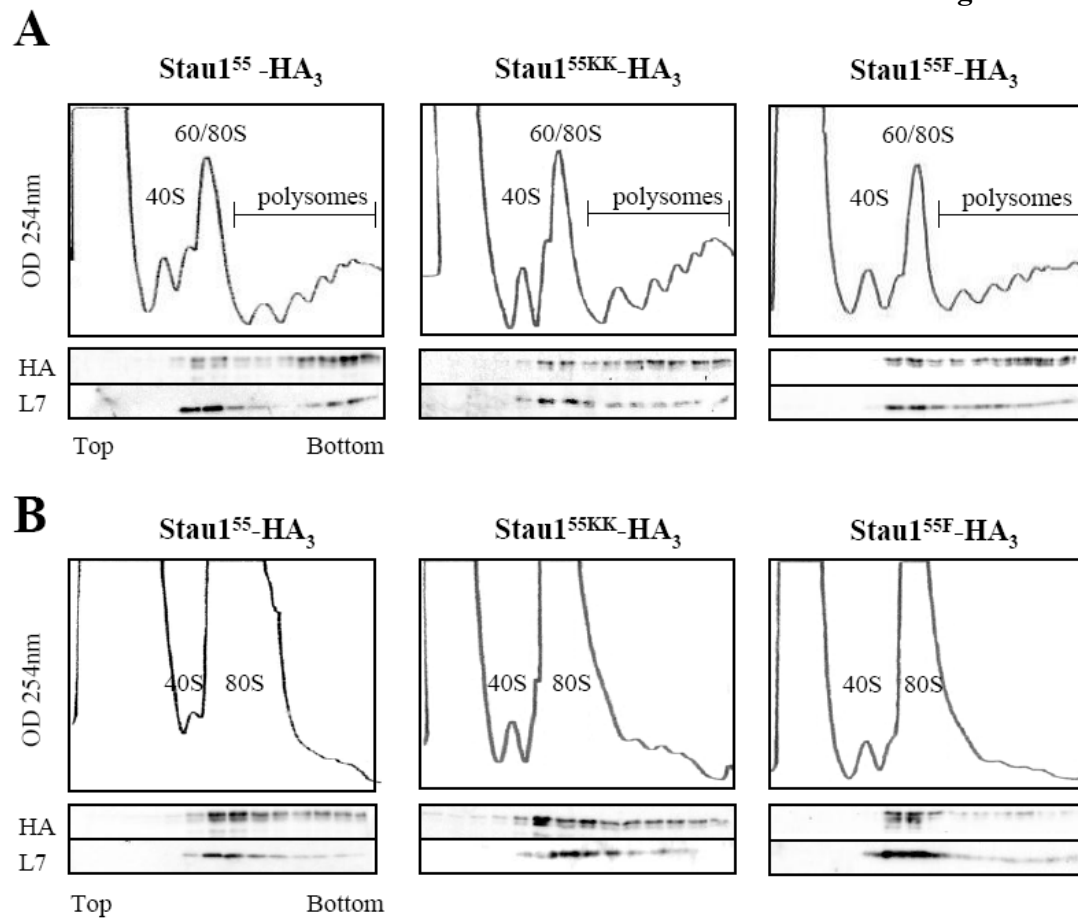


Figure 8

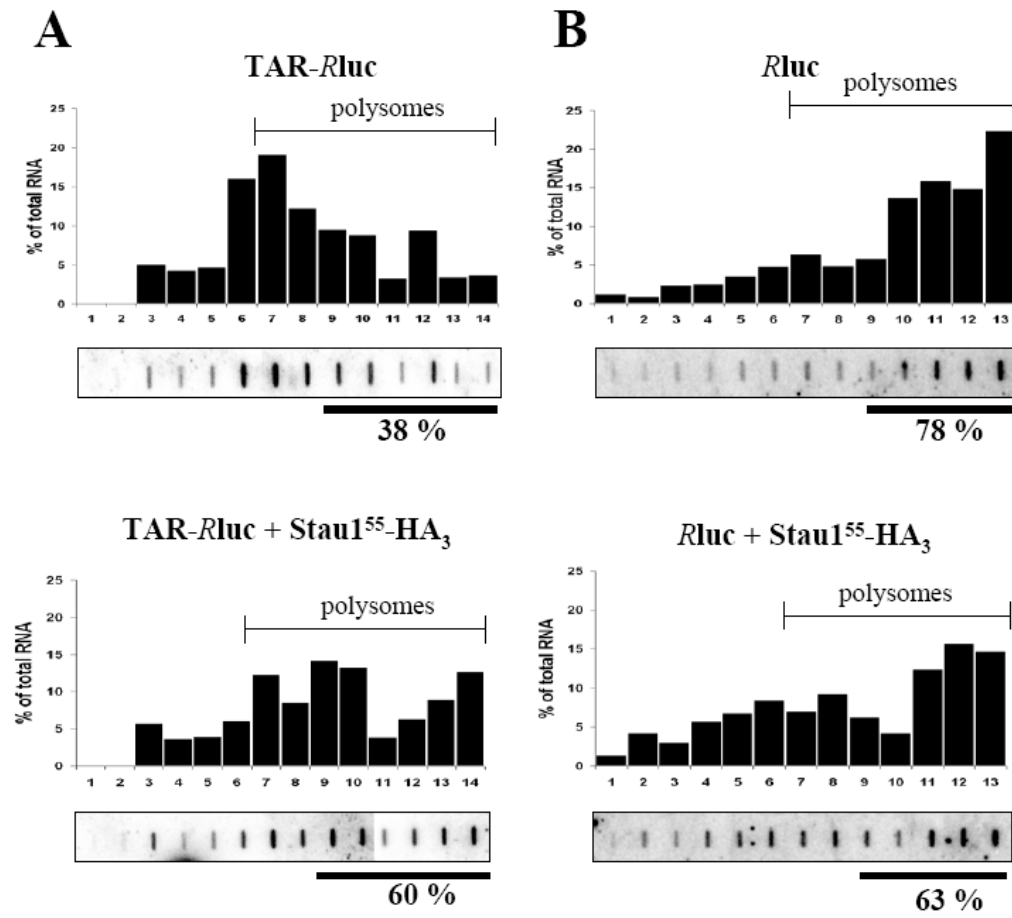
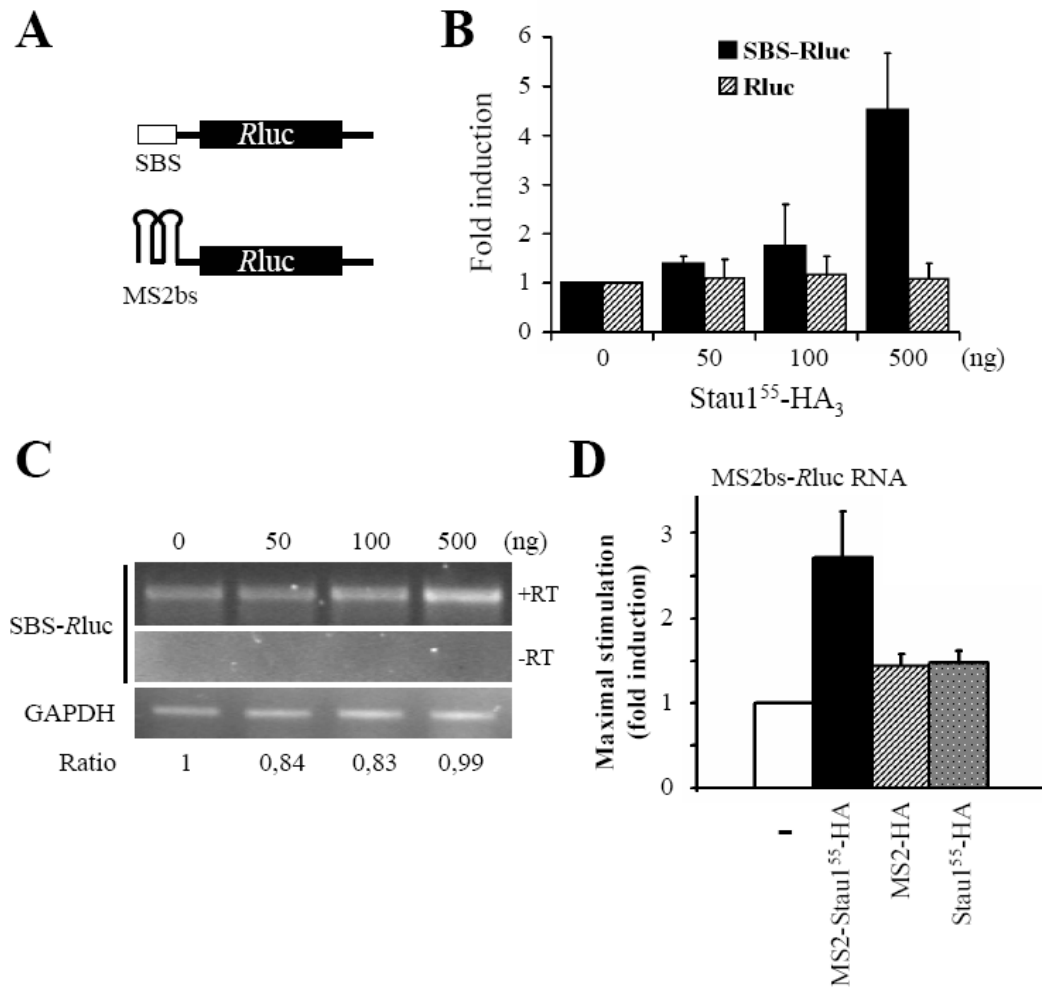


Figure 9



3.2. Article 2: Stau1 stimulates translation of a select group of mRNAs in HEK293T cells

3.2.1. Mise en contexte

Les travaux montrés dans cet article furent initiés suite à la publication de l'article 1 présenté ci-dessus. Puisque nous savions que Stau1 humain avait la capacité de stimuler la traduction d'un ARN messenger rapporteur lié en 5'UTR, nous désirions identifier des messagers cellulaires endogènes pouvant voir leur traduction stimulée par Stau1. Ceci, dans l'optique de confirmer le modèle que nous avons élaboré grâce à l'emploi de gènes rapporteurs et d'identifier des phénomènes cellulaires sur lesquels Stau1 pourrait avoir une influence. La disponibilité des micropuces à ADN nous a donc permis de mener à bien cette étude et d'identifier une population d'ARN messagers dont la traduction est stimulée par Stau1. Ces données sont présentées dans l'article 2 qui suit.

Notes

-Contribution de chacun des auteurs :

S. Dugré-Brisson : Gradients de sucrose, purification de l'ARN total et des polysomes, analyse des micropuces d'ADN, validation des données par RT-PCR, préparation des échantillons pour la validation par qRT-PCR, immunoprécipitations suivies de RT-PCR.

K. Boulay : Gradients de sucrose.

L. DesGroseillers : Supervision générale.

Stau1 stimulates translation of a select group of mRNAs in HEK293T cells

Samuel Dugré-Brisson, Karine Boulay and Luc DesGroseillers¹

Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada. H3C 3J7

¹ **To whom correspondence should be addressed:**

Luc DesGroseillers : Département de biochimie, Université de Montréal, PO Box 6128
Centre Ville, Montréal, Québec, Canada. H3C 3J7. Phone : 514-343-5802. Fax : 514-343-
2210. Email : luc.desgroseillers@umontreal.ca

3.2.2. Summary

Summary

Human Stau1 is a double-stranded RNA-binding protein that participates in a variety of cellular processes. These include mRNA localization, post-transcriptional gene regulation including translational control of certain mRNAs. Indeed, binding of Stau1 in the 5' UTR of some mRNAs stimulates translation of these mRNAs. In order to identify the cellular RNAs whose translation is regulated by Stau1, we carried out a microarray analysis of mRNAs enriched in heavy polysome fractions of Stau1-expressing cells as compared to those in control cells. Thirty five mRNAs were found to be enriched at least 1.5 fold in heavy polysome fractions following Stau1 over-expression. Microarray data were validated by RT-PCR and qRT-PCR amplification techniques with 4 of these mRNAs. Immunoprecipitation of Stau1-containing ribonucleoprotein complexes (mRNP) revealed that these mRNAs co-immunopurified with Stau1 showing that they are part of the same mRNPs. Gene ontology classification of these mRNAs reveals that a large number of them are implicated in mRNA transcription or transcription regulation. These results suggest that Stau1 regulates the translation of a particular subset of messenger RNAs in the cells which is consistent with the post-transcriptional operon hypothesis.

3.2.3. Introduction

Introduction

The comprehension of the mechanisms implicated in the translation of messenger RNAs has required tremendous amounts of work for decades. Over the years, developing technologies allowed the scientists to generate information on the regulated expression of the entire genome. Genome-wide analysis have been carried out to understand the translational status of the cells and the translation levels of the bulk of mRNAs (Arava et al., 2003). Microarray analysis of polyribosome-associated mRNAs (Arava, 2003; Hieronymus and Silver, 2004) is one of the technique for such studies. This technique has been widely used to identify transcripts whose translational levels are modified in response to specific cell conditions such as stress or stimulus. For example, translational regulation of cellular mRNAs during viral infections of human cells, change of carbon source in yeast or BDNF treatment of rodent neurons has lead to the observation that specific subsets of mRNAs are enriched in polysomes of treated cells compared to those of control cells (Kash et al., 2002; Kuhn et al., 2001; Schratt et al., 2004). Similarly, mRNAs found in mRNPs containing specific RNA-binding proteins have been identified and these studies gave resourceful information concerning the cellular pathways in which these RNA-binding proteins are involved (Furic et al., 2008; Gerber et al., 2004; Tenenbaum et al., 2000). All of these studies support the post-transcriptional operon hypothesis (Keene and Tenenbaum, 2002) that suggests that genes with common functions can be classified as groups which are regulated by specific RNA-binding proteins through recognition of sequences shared by different populations of mRNAs.

Human Staufen (Stau)1 is a member of the double-stranded RNA-binding protein family that is characterised by the presence of double-stranded RNA-binding domain(s) (dsRBD). Stau1 contains 4 dsRBDs that correspond to the dsRBDs 2 to 5 of the *Drosophila melanogaster* Staufen protein. dmStaufen is required for the proper localization of the *bicoid* and *oskar* transcripts to the anterior and posterior ends of the oocyte, respectively. In *Drosophila*, dmStaufen was also shown to be required for the translational derepression of *oskar* mRNA once it is properly localized. Studies showed that Staufen is important for learning and long-term memory in *Drosophila* and in mammals (Dubnau et al., 2003; Lebeau et al., 2008b). Recently, Staufen1-mediated mRNA decay (SMD) pathway, a post-transcriptional mechanism of gene regulation, was identified (Kim et al., 2005). It takes place when Stau1 binds a Staufen-binding site (SBS) in the 3'UTR region of an mRNA and recruits Upf1 (Kim et al., 2005). Genome-wide analysis of mRNAs isolated from cells in which Stau1 or Upf1 were knocked-down showed that this phenomenon is widely used in the cell (Kim et al., 2007). The mRNAs found in Stau1-containing mRNPs were also recently identified through microarray experiments (Furic et al., 2008).

Recently, we showed that Stau1 stimulates translation of reporter mRNAs when bound to their 5'UTR (Dugre-Brisson et al., 2005). In order to find endogenous cellular mRNAs that could be translationally stimulated by Stau1, we compared by microarray hybridization polyribosome-associated mRNAs from control and Stau1-HA₃ over-expressing cells. Our

results identify a restricted subset of mRNAs that are enriched in the heavy polysomes fractions of Stau1-HA₃ over-expressing cells. These microarray results were validated by RT-PCR and qRT-PCR and selected transcripts were found to be present in endogenous Stau1-containing mRNPs.

3.2.4. Experimental procedures

Experimental procedures

Polysome purifications

HEK293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone) and seeded at 6×10^6 cells per plate in 15 cm plates 24 hours before transfection. Cells were transfected with 15 μ g of pcDNA3 RSV or pcDNA3 RSV Stau1⁵⁵-HA₃ with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 24 hours post-transfection, 200 μ L of cycloheximide (10 mg/ml) (BioShop) was added to the culture media (dilution 1/100) for 10 minutes. Cells were then washed twice with ice-cold PBS containing cycloheximide and harvested in 4 ml of PBS/cycloheximide. Cells were centrifuged at 500 g for 5 minutes and incubated on ice for 3 minutes in RNase-free lysis buffer (10 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH pH 7.3, 15 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 100 μ g/ml cycloheximide, 100 U/ml of RNase inhibitor, 0,5 mg/ml Heparin and 0.5% NP-40) followed by 10 strokes in a Potter. Cell debris were pelleted by centrifugating 10 minutes at 4°C at 13 500 rpm. Supernatant was harvested and quantified by taking the optical density (OD) at 260 nm. Approximately 30 OD₂₆₀ were centrifuged on a continuous 15 – 45 % sucrose gradient containing 100 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 10mM HEPES-KOH pH 7.3, 2 mM DTT and 100 μ g/ml cycloheximide in a TH-641 rotor (Sorvall) at 38 000 rpm for 150 minutes at 4°C. Fourteen fractions of ~800 μ l were recovered and the ribosomal profile was monitored at OD₂₅₄ with a gradient fractionator (ISCO, Lincoln, USA). RNA was extracted from fractions containing heavy polysomes with Trizol LS reagent (Invitrogen) and used to generate cRNA probes and hybridize microarrays.

Microarray analysis

Hybridization procedures for the arrays were described in (Furic et al., 2008). To identify the mRNAs enriched in polysomes of Stau1⁵⁵-HA₃ expressing cells, signal intensities of each probe set obtained with cRNA probes generated from polysomes of Stau1⁵⁵-HA₃ expressing cells were compared with those of control cells using statistical analysis on mean-scale normalized MAS5 data with a P-value limit of 0.05. Probe sets with a fold enrichment of at least 1.5 fold and having a difference of more than 150 arbitrary units as compared to the control were kept for analysis.

Immunoprecipitations and RT-PCR amplification

For immunoprecipitations, HEK293T cells were washed twice with PBS and put on ice for 20 minutes in lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 15 mM EGTA, 100 mM NaCl and 1 mM DTT). Lysates were cleared by centrifugation at 17 000 g for 10 minutes followed by a 1 hour pre-clearing with 15 µL of 50% protein A-sepharose slurry (Amersham) at 4°C. After centrifugation, the supernatant was incubated with mouse monoclonal anti-GFP or anti-Stau1 (11C6) antibodies (1/300) and 200 µg of bacterial tRNA for 2 hours at 4°C, then with 25 µL of 50% protein A-sepharose slurry for 2 hours at 4°C. Immune complexes were washed three times with the lysis buffer and eluted from the resin by heating at 95°C for 5 minutes in elution buffer (100 mM Tris-Cl pH 7.4, 200 mM DTT and 4% SDS). RNAs were isolated by Trizol extraction. RT-PCR reactions were carried out

with the One-Step RT-PCR Kit from Qiagen on equal volumes of eluate from anti-GFP and anti-Stau1 IPs. qRT-PCR amplifications were carried out by the Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC) genomics core facility on the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR system.

3.2.5. Results and discussion

Results and Discussion

As a first step aiming to investigate the capacity of Stau1 to stimulate the translation of specific mRNAs, we determined whether Stau1 affects the general translation of the cell. To this end, we labeled newly synthesized proteins with ^{35}S -methionine for 240 min and analyzed proteins in the cell extracts by scintillation counting. We compared ^{35}S -methionine incorporation in mock transfected HEK293T cells and in cells transfected with plasmids coding for Stau1-HA₃ or shRNA against Stau1. No difference was observed in the general protein synthesis rate in these cells even when Stau1 was overexpressed or knocked-down by shRNA compared to untransfected cells (data not shown). This result suggests that Stau1, rather than regulating general translation, influences translation of specific transcripts in the cell.

To identify mRNAs whose translation is regulated by Stau1, HEK293T cells were co-transfected with the empty vector as control or plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA₃. Twenty-four hours post-transfection, cells were lysed and the lysates were then separated in a 15-45% sucrose gradient to isolate polysomes. During elution, heavy polysome fractions were identified by real time A_{254} (Figure 1). RNA was isolated from these fractions of the gradient and used to generate cRNA probes for microarrays hybridization.

RNA was isolated from heavy polysomes fractions of 3 independently transfected HEK293T cells populations. In each experiment, mRNAs from Stau1⁵⁵-HA₃ and empty

vector transfected cells were used as a source of probes to hybridize commercially available human DNA oligonucleotides Affymetrix microarrays and to perform a genome-wide identification of mRNAs specifically enriched in the polysomes of Stau1⁵⁵-HA₃ expressing cells. Enriched transcripts were identified by a statistical (unpaired) analysis on the mean-scale normalised MAS5 data with a *P*-value threshold of 0.05. Thirty-five genes were identified on the basis that the microarray signals were at least 1.5 fold higher when hybridized with probes derived from polysomes of Stau1⁵⁵-HA₃ expressing cells than when hybridized with probes derived from the control cells (Table I).

To confirm the differential localization in polysomes of selected mRNAs, HEK293T cells were co-transfected with the empty vector or plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA₃ and SBS-Rluc. Twenty-four hours post-transfection, luciferase activity was determined to control for the translational stimulation of SBS-Rluc by Stau1 (data not shown) as it was previously reported (Dugre-Brisson et al., 2005). Total mRNAs were first isolated from an aliquot of these cell extracts. Then, cells lysates were centrifuged in a 15-45% sucrose gradient, polysomes isolated and mRNA purified as above. Total mRNAs and polysome-associated mRNAs were RT-PCR amplified with specific sets of primers to validate the microarray results. As expected, mRNA coding for Art1 and for the reporter SBS-Rluc were enriched in polysomes from Stau1⁵⁵-HA₃ expressing cells as compared to those from mock transfected cells whereas mRNAs coding for β -actine, GAPDH and TBC1D3 were not (Fig. 2A). Other transcripts were validated by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) which is a more

reliable method. qRT-PCR reactions were carried on polysomal RNA and on total RNA to normalize for changes in RNA levels. This rules out the possibility of a transcriptional effect reflecting in an enrichment of certain RNA species in polysomes. As shown in Figure 2B, RAR γ , RAB43 and Syng3 are also found to be enriched in polysomes of Stau1⁵⁵-HA₃ expressing cells, thus confirming the validity of the microarrays experiments.

Next, we determined whether these mRNAs are molecular targets for Stau1 binding. To do so, untransfected HEK293T cells were lysed and endogenous Stau1-containing mRNPs were immunoprecipitated with anti-Stau1 antibody. As control, anti-GFP antibody was used for immunoprecipitation. Co-immunoprecipitated mRNAs were isolated and RT-PCR amplified to detect their presence in Stau1 mRNPs. As shown in Figure 3, mRNAs coding for RAR γ , RAB43 and Syng3 were specifically immunoprecipitated with the anti-Stau1 antibody but not with the anti-GFP antibody, suggesting that they are present in endogenous Stau1-containing mRNPs. Our previous study using immunoprecipitation of Stau1-HA and microarray hybridization did not detect these mRNAs in Stau1-HA₃-containing mRNPs (Furic et al., 2008). It is possible that the Stau1-HA over-expression or the highly stringent statistical protocol that was used for the microarray analyses prevented the identification of some mRNAs.

All these results suggest that Stau1 can stimulate the translation of a specific population of mRNAs in the cell. This is supported by the fact that specific transcripts are enriched in

heavy polysomes of cells that over-express Stau1⁵⁵-HA. In the literature, this phenomenon was often considered as a reliable evidence for increased translational efficiency of mRNAs (Hieronymus and Silver, 2004). However, other cellular structures can sometimes cofractionate with polysomes as recently pinpointed in *D. melanogaster* with the presence of pseudo-polysomes (Thermann and Hentze, 2007). Although we cannot exclude the possibility that the observed enrichment of mRNAs in fractions containing heavy polysomes is due to their sequestration in large molecular complexes that co-fractionate with polysomes, the data presented in this study are consistent with our previous results that showed that Stau1 stimulates translation of a specific population of mRNAs when bound in their 5'UTR (Dugre-Brisson et al., 2005). The mapping of the Stau1-binding site on these mRNAs will help to further validate this phenomenon.

With the objective to identify cellular processes for which Stau1 is important, we analysed the probe set list with the DAVID functional annotation tool (Dennis et al., 2003) to associate the identified mRNAs with cellular functions. As shown in Table II, the mRNAs whose translation is regulated by Stau1 are involved in different activities in the cell. Interestingly, the main functional group is related to transcription and its control, suggesting that Stau1 might be implicated in some kind of retroaction loop to regulate the transcriptional rate of certain genes in HEK293T cells.

In an interesting manner, one hundred and eighteen genes were identified on the basis that the microarray signals were at least 2 fold lower when hybridized with probes derived from polysomes of Stau1⁵⁵-HA₃ expressing cells than when hybridized with probes derived from the control cells. Although more data needs to be uncovered, this could be explained by the fact that these transcripts could be targets of SMD and therefore less present in the cell and in the polysomes. Another possible explanation is that Stau1 could stimulate the translation of a transcriptional repressor that would influence the transcription of those genes. The cellular functions associated to these genes are presented in Table III.

The results presented in this article will be of great value in order to help us uncover the mechanism(s) used by Stau1 to stimulate the translation of mRNAs. The identification of the SBS present on the 35 transcripts will allow us to confirm whether or not the SBS has to be located exclusively in the 5'UTR of a mRNA in order to observe translational stimulation by Stau1. Also, having the opportunity to work with an endogenous target of Stau1 will allow us to verify if certain protein partners of Stau1 are required for its translational stimulation activity. Ultimately, this could provide us with insights on Stau1's cellular activities and therefore with a better understanding of the phenomena Stau1 is required for such as memory and local translation of mRNAs.

3.2.6. Acknowledgements

Acknowledgements

The authors thank Dr L. Brakier-Gingras (Université de Montréal) and Dr M. Drolet (Université de Montréal) for granting the use of their gradient fractionator apparatus. The authors thank L. Cournoyer for help in cells culture, A. Ponton from Genome Quebec Innovation Centre for microarray screening and analysis and Dr P. Chagnon from IRIC for the qPCR amplifications. K. B. and S. D.-B. were supported by studentships from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to L. D. G.

3.2.7. Reference list

Reference List

- 1 Arava, Y., Wang, Y., Storey, J. D., Liu, C. L., Brown, P. O. and Herschlag, D. (2003) Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 3889-3894
- 2 Arava, Y. (2003) Isolation of polysomal RNA for microarray analysis. *Methods Mol Biol.* **224**, 79-87
- 3 Hieronymus, H. and Silver, P. A. (2004) A systems view of mRNP biology. *Genes Dev.* **18**, 2845-2860
- 4 Kash, J. C., Cunningham, D. M., Smit, M. W., Park, Y., Fritz, D., Wilusz, J. and Katze, M. G. (2002) Selective translation of eukaryotic mRNAs: functional molecular analysis of GRSF-1, a positive regulator of influenza virus protein synthesis. *J Virol.* **76**, 10417-10426
- 5 Kuhn, K. M., DeRisi, J. L., Brown, P. O. and Sarnow, P. (2001) Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. *Mol Cell Biol.* **21**, 916-927
- 6 Schratt, G. M., Nigh, E. A., Chen, W. G., Hu, L. and Greenberg, M. E. (2004) BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci.* **24**, 7366-7377
- 7 Furic, L., Maher-Laporte, M. and DesGroseillers, L. (2008) A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Stauf1- and Stauf2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA.* **14**, 324-335
- 8 Gerber, A. P., Herschlag, D. and Brown, P. O. (2004) Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol.* **2**, E79
- 9 Tenenbaum, S. A., Carson, C. C., Lager, P. J. and Keene, J. D. (2000) Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 14085-14090
- 10 Keene, J. D. and Tenenbaum, S. A. (2002) Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell.* **9**, 1161-1167
- 11 Lebeau, G., Maher-Laporte, M., Topolnik, L., Laurent, C. E., Sossin, W., Desgroseillers, L. and Lacaille, J. C. (2008) Stauf1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol.* **28**, 2896-2907
- 12 Dubnau, J., Chiang, A. S., Grady, L., Barditch, J., Gossweiler, S., McNeil, J., Smith, P., Buldoc, F., Scott, R., Certa, U., Broger, C. and Tully, T. (2003) The stauf/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol.* **13**, 286-296

- 13 Kim, Y. K., Furic, L., Desgroseillers, L. and Maquat, L. E. (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell*. **120**, 195-208
- 14 Kim, Y. K., Furic, L., Parisien, M., Major, F., DesGroseillers, L. and Maquat, L. E. (2007) Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *EMBO J.* **26**, 2670-2681
- 15 Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A. J. and DesGroseillers, L. (2005) Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res.* **33**, 4797-4812
- 16 Thermann, R. and Hentze, M. W. (2007) Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature*. **447**, 875-878
- 17 Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C. and Lempicki, R. A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, P3

3.2.8. Figures Legends

Figures Legends

Figure 1. Polysomes microarray analysis of transfected cells. Polysomes fractionation and microarray experiments were carried in triplicate with RNAs isolated from empty vector and pcDNA3 RSV Stau1⁵⁵-HA₃ transfected HEK 293T cells fractionated on a 15-45% linear sucrose gradient. After the elution, RNA was isolated from the heavy polysome fractions (5 or more ribosomes by RNA molecule) and used for the synthesis of probes to hybridize microarrays.

Figure 2. RT-PCR and qPCR validation of microarray experiments. RNAs were isolated from heavy polysomes fractions of HEK 293T cells transfected with a SBS-Rluc expressor and the empty vector or pcDNA3 RSV Stau1⁵⁵-HA₃. **(A)** RT-PCR amplifications of Art1 (enriched in Stau1⁵⁵-HA₃ polysomes), TBC1D3 (not enriched in Stau1⁵⁵-HA₃ polysomes) and SBS-Rluc (known to be translationally stimulated by Stau1) were conducted on heavy polysomes isolated RNAs. β -actine and GAPDH amplifications serve as loading controls. **(B)** qPCR amplifications of RAR γ , Syngr3 and Rab43 were carried on total RNA extracts and heavy polysomes fractions extracts. The polysomal fold enrichment was obtained by dividing the quantification of each gene in Stau1⁵⁵-HA₃ polysomes by the quantification in control polysomes. The result obtained was normalized to the relative abundance of each gene in total RNA extracts for each condition.

Figure 3 RT-PCR amplification of selected mRNAs following immunoprecipitation.

Anti-Stau1 or anti-GFP antibodies were used for immunoprecipitations from untransfected HEK 293T cells. RNA was extracted from the immunoprecipitates and subjected to RT-PCR amplification.

3.2.9. Tables and figures

TABLE I. List of genes enriched in polysomes of cells overexpressing Stau1

Gene name	Symbol	Probe set	Fold enrichment in polysomes compared to control
ADP-ribosyltransferase 1	ART1	207919_at	5,286
defensin beta 124	DEFB124	1568377_x_at	4,848
single stranded DNA binding protein 4	SSBP4	229270_x_at	4,820
DnaJ (Hsp40) homolog subfamily A member 4	DNAJA4	220395_at	2,875
methyl-CpG binding domain protein 1	MBD1	208595_s_at	2,514
Homo sapiens cDNA FLJ33147 fis clone UTERU2000218.		1557276_at	2,490
RAB3A member RAS oncogene family	RAB3A	204974_at	2,219
Homo sapiens cDNA FLJ20182 fis clone COLF0190		233476_at	2,009
ATP-binding cassette sub-family B (MDR/TAP) member 9	ABCB9	207321_s_at	1,945
retinoic acid receptor gamma	RARG	204189_at	1,929
diacylglycerol kinase zeta 104kDa	DGKZ	239342_at	1,878
pannexin 2	PANX2	239067_s_at	1,805
LSM4 homolog U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	LSM4	212924_s_at	1,743
chromosome 6 open reading frame 83	C6orf83	226836_at	1,733
ribosomal protein L23	RPL23	200888_s_at	1,697
calcium channel voltage-dependent gamma subunit 4	CACNG4	62987_r_at	1,671
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1	NFKBIL1	209973_at	1,657
RAB43 protein	LOC339122	225632_s_at	1,656
laminin alpha 4	LAMA4	210089_s_at	1,626
zinc finger and BTB domain containing 3	ZBTB3	1553858_at	1,570
putative small membrane protein NID67	NID67	223276_at	1,553
synaptogyrin 3	SYNGR3	205691_at	1,549
TAR (HIV) RNA binding protein 2	TARBP2	239389_at	1,545
Homo sapiens mRNA		226548_at	1,541
ceroid-lipofuscinosis neuronal 3 juvenile (Batten Spielmeier-Vogt disease)	CLN3	209275_s_at	1,539
hypothetical protein MGC2474	MGC2474	206180_x_at	1,535
thymopoietin	TMPO	227578_at	1,533
mitochondrial ribosomal protein L51 /// mitochondrial ribosomal protein L51	MRPL51	224334_s_at	1,532
hypothetical protein MGC11335 /// hypothetical protein MGC11335	MGC11335	221028_s_at	1,529
nephronophthisis 1 (juvenile)	NPHP1	238844_s_at	1,527
kinesin family member 9	KIF9	230701_x_at	1,519
Homo sapiens hypothetical protein LOC285103 mRNA (cDNA clone IMAGE:5273139)		227966_s_at	1,517
chemokine (C-X-C motif) receptor 4	CXCR4	209201_x_at	1,504
activating transcription factor 7 interacting protein 2	ATF7IP2	228381_at	1,503
hypothetical protein LOC89887	LOC89887	236269_at	1,501

TABLE II. Summary of gene ontology of increased genes

Gene ontology group	%
Cell structure and motility	21.2
Protein modification	21.2
mRNA transcription	39.4
Transport	18.2
General vesicle transport	15.2
Gametogenesis	15.2
mRNA transcription regulation	51.5

TABLE III. Summary of gene ontology of decreased genes

Gene ontology group	%
mRNA transcription regulation	51,5
Nucleoside , nucleotide and nucleic acid metabolism	37,6
mRNA splicing	36,6
Pre-mRNA processing	31,7
mRNA transcription	31,7
MHCI-mediated immunity	28,7
Cation transport	28,7
Proteolysis	26,7
T-cell mediated immunity	20,8
Ion transport	17,8
Oxidative phosphorylation	13,9
Skeletal development	7,9
Electron transport	7,9
Mitosis	7,9
General vesicle transport	7,9
General mRNA transcription activities	6,9
DNA metabolism	6,9
Sulfur redox metabolism	3,0

Figure 1

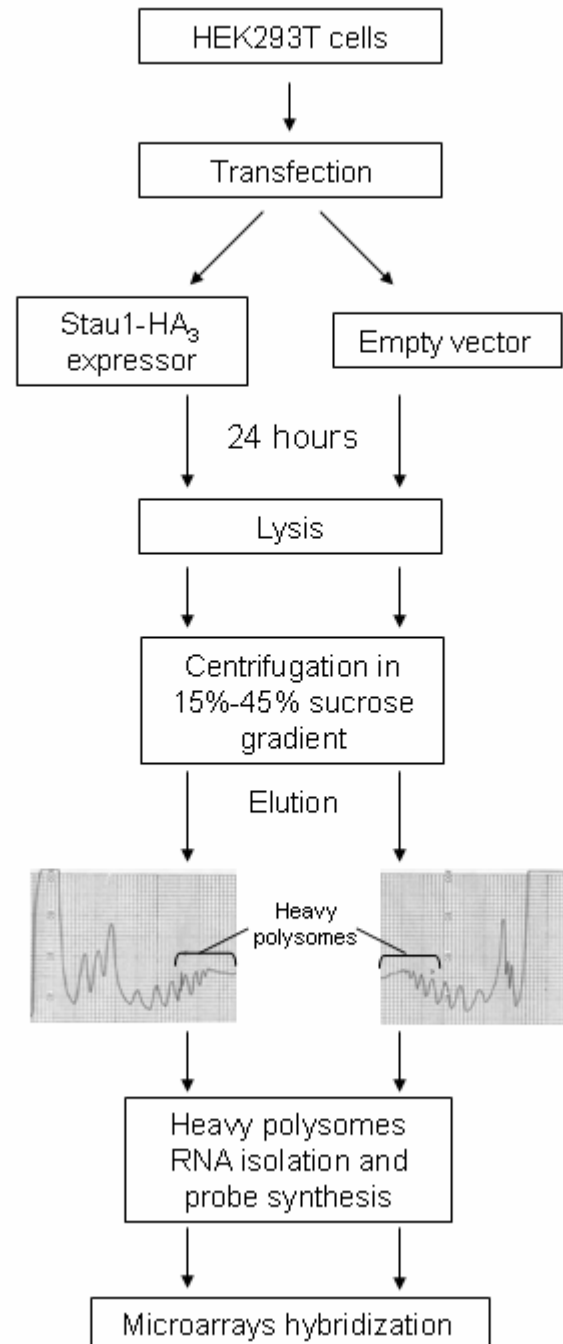


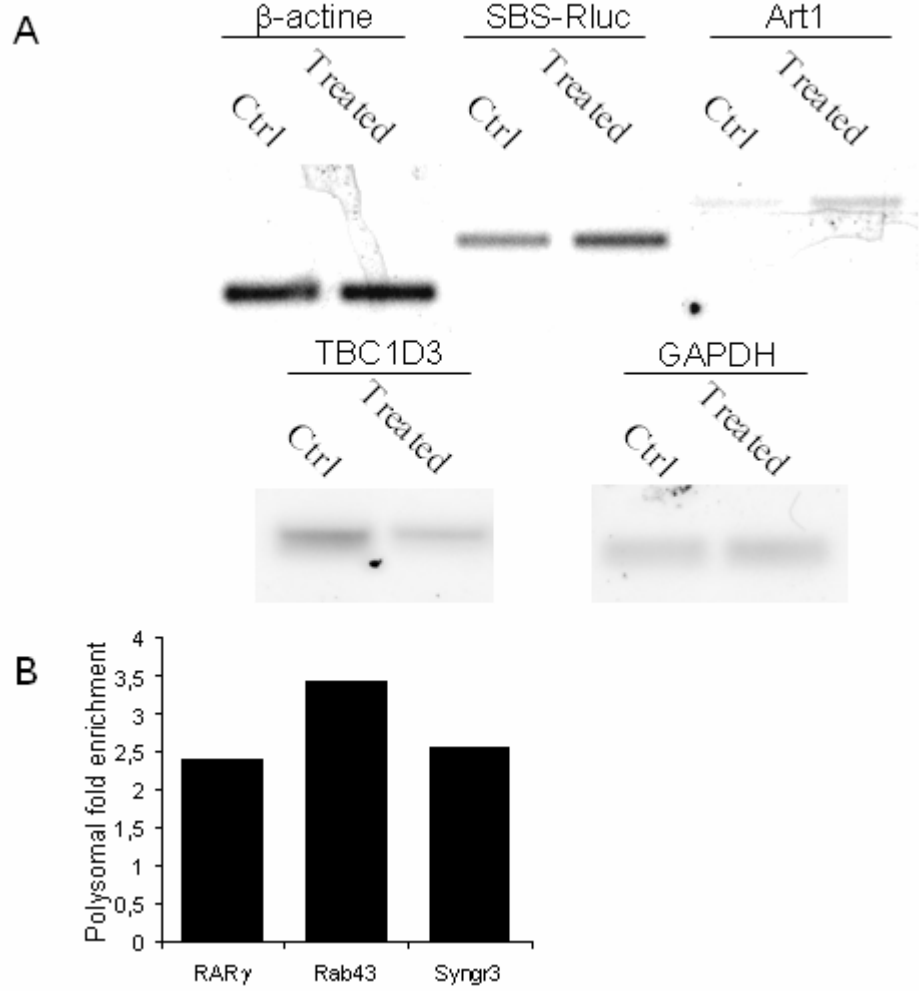
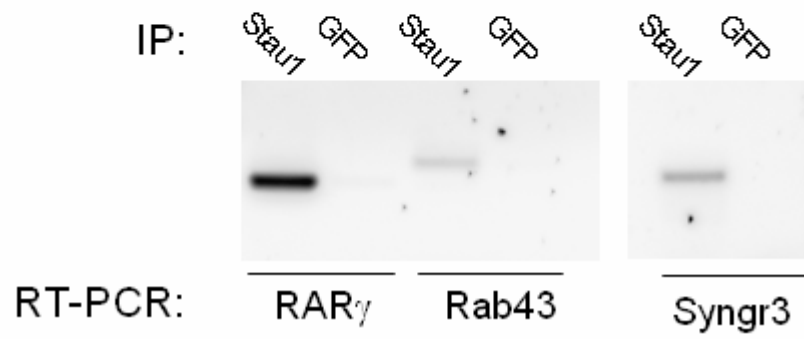
Figure 2

Figure 3



3.3. Article 3: Characterization of the molecular determinants required for Staufen1 self-association

3.3.1. Mise en contexte

Lorsque ces travaux furent entamés, des indices suggéraient déjà que Stau1 était en mesure de s'associer avec lui-même ou qu'à tout le moins, plusieurs molécules de Stau1 étaient présentes dans les même complexes. En effet, lors d'immunoprécipitations contre Stau1, il était possible de co-immunoprécipiter l'isoforme Stau1ⁱ (Duchaine et al., 2000). De plus, une technologie permettant de vérifier l'interaction directe entre deux protéines venait d'être rendue accessible aux membres du laboratoire du Dr Luc DesGroseillers. Le Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) fut donc employé afin d'investiguer la capacité de Stau1 à s'associer à lui-même. Il faut également noter qu'il était connu que certaines protéines liant l'ARN double-brin, tel PKR, TRBP et ADAR, était en mesure de dimériser et ce, via leurs dsRBDs. Cet article montre donc qu'une molécule de Stau1 est en mesure d'interagir directement avec au moins une autre molécule de Stau1 ainsi que l'identification des déterminants moléculaires requis pour une telle interaction.

Notes

-Contribution de chacun des auteurs :

C. Martel : Mise au point du BRET Stau1/Stau1, construction de différents mutants de Stau1 pour le BRET, essais de BRET avec les mutants de Stau1, construction de plasmides pour le double-hybride, mise au point du système de double-hybride chez la levure.

S. Dugré-Brisson : Co-immunoprécipitations dans les HEK 293T, BRET dans les lysats cellulaires en présence de RNase A, construction de différents mutants de Stau1 pour le BRET, essais de BRET avec les mutants de Stau1, construction de plasmides pour le double-hybride, essais de double-hybride en milieu liquide.

K. Boulay : construction de différents mutants de Stau1 pour le BRET.

T. Duchaine : Essais de « pull-down ».

L. DesGroseillers : Supervision générale.

* Contribution égale des deux premiers auteurs tel que mentionné en première page de l'article.

Characterization of the molecular determinants required for Staufen1 self-association

Catherine Martel^{*1}, Samuel Dugré-Brisson^{*}, Karine Boulay, Thomas Duchaine² and Luc DesGroseillers[‡]

Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada. H3C 3J7

^{*} The first two authors contributed equally to this work.

[‡] **To whom correspondence should be addressed:**

Luc DesGroseillers : Département de biochimie, Université de Montréal, PO Box 6128
Centre Ville, Montréal, Québec, Canada. H3C 3J7. Phone : 514-343-5802. Fax : 514-343-
2210. Email : luc.desgroseillers@umontreal.ca

¹: **Present address:** Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, NY 14853,
USA and Boyce Thompson Institute for Plant Research, Tower Road, Cornell University,
Ithaca, NY 14853, USA. Email: cm299@cornell.edu

²: **Present address:** Department of biochemistry, McGill University, and McGill Cancer
Center, McIntyre Medical Sciences Building, 3655 Promenade Sir-William-Osler,
Montréal, Qc, Canada. H3G 1Y6. Phone: 514-398-3535. Fax: 514-398-6769. Email:
thomas.duchaine@mcgill.ca.

3.3.2. Synopsis

Synopsis

Several RNA-binding proteins are known to homo- or hetero-dimerize and this phenomenon is required for their activity. Staufen (Stau) 1 is a double-stranded RNA-binding protein involved in several mRNAs post-transcriptional regulation mechanisms, such as mRNA transport, mRNA decay and translation regulation. Stau1 is part of large ribonucleoprotein complexes that contain RNA, ribosomes and numerous proteins. In this manuscript, co-immunoprecipitation and Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) assays were used to accumulate evidence that Stau1 self-associates in live cells. Our results indicate that Stau1 RNA-binding activity is involved in Stau1 self-association. Nevertheless, expression of RNA-binding defective Stau1 mutants and treatment of cell extracts with RNases showed that direct protein-protein interaction also plays a significant role in this function. *In vitro* pull-down assays further support this conclusion. BRET assays following expression of Stau1 deletion mutants indicated that Stau1 double-stranded RNA-binding domain 5 (dsRBD5) is the major determinant for protein-protein interaction and that dsRBD2 plays a secondary role. These results are consistent with a model in which the dsRBD2 and dsRBD5 of two Stau1 molecules self-interact in a parallel head-to-head manner when binding to a dsRNA substrate.

3.3.3. Introduction

Introduction

In biological systems, proteins must interact with other biomolecules to elicit physiological responses (Marianayagam et al., 2004). Many proteins can self-associate to generate dimers and/or higher-order oligomers that are essential for their function, structure and/or regulation. This property of certain proteins to dimerize is in turn important for cellular functions. Enzymatic regulation, cell signalling, DNA binding and regulation of gene expression are a few examples among all the molecular activities that are regulated by protein self-interaction. Dimerization/oligomerization is a phenomenon that is tightly regulated and that often involved post-translational protein modifications such as phosphorylation (for review see (Marianayagam et al., 2004)).

Double-stranded RNA-binding proteins (dsRBP) are a family of proteins involved in diverse cellular processes such as RNA editing, RNA metabolism, mRNA localization, translational control, RNA interference, interferon response and apoptosis (for reviews see (Doyle and Jantsch, 2002; Lunde et al., 2007)). These proteins are characterized by a conserved consensus amino acid sequence that folds into a domain involved in double-stranded RNA-binding (dsRBD). The α - β - β - β - α structure of this domain interacts with the phosphate-backbone of the double helix RNA in its minor and major grooves (Ryter and Schultz, 1998). Many dsRBPs contain more than one dsRBDs and it was hypothesised that this feature may confer specificity for certain RNA structures since dsRBD by themselves show little substrate specificity in vitro (Lunde et al., 2007). Interestingly,

dsRBPs often contain truncated dsRBDs in which amino acid sequence conservation is restricted to the C-terminal half of the consensus (Lunde et al., 2007). Most of these half domains are unable to bind dsRNA. In addition to their role in RNA recognition and binding, dsRBDs were also described as functional determinants for homo- or heterodimerization of several proteins. Among the proteins known to dimerize through their dsRBDs are TRBP2, XlrpA, ADAR2, PACT and Rnt1p. For many of these proteins, structural rearrangements resulting from homo- and/or hetero-dimerization are required for functional activation and therefore dimerization may serve as a molecular regulator (Daher et al., 2001; Peters et al., 2001; Valente and Nishikura, 2007).

Staufen is a member of the dsRBP family. It was first described in *Drosophila melanogaster* where it is required during development for the proper localization of the *oskar* and *bicoid* transcripts at the posterior and anterior poles of the oocytes, respectively. Staufen was also shown to be required for translational derepression of *osk* mRNA once properly localized (Micklem et al., 2000). In humans, two homologous Staufen genes, *Stau1* and *Stau2*, were identified (Buchner et al., 1999; DesGroseillers and Lemieux, 1996; Duchaine et al., 2002; Kiebler et al., 1999; Marion et al., 1999; Wickham et al., 1999). Stau1 is a modular protein containing two full length dsRBDs able to bind RNAs (dsRBD3, dsRBD4), two half domains that do not bind RNAs (dsRBD2 and dsRBD5) and a tubulin-binding domain (TBD). Stau1 is a multi-functional protein involved in different pathways of RNA metabolism. In neurons, Stau1 is required for the transport and localization of specific mRNAs to dendrites (Kanai et al., 2004; Kiebler et al., 1999). In the hippocampus,

its down-regulation was shown to prevent the establishment of forskolin-induced long term potentiation and to alter spine morphology (Lebeau et al., 2008a). In addition to its role in mRNA transport, Stau1 is also involved in post-transcriptional mRNA regulation mechanisms. When bound to the 3'UTR of an mRNA, Stau1 can recruit the non-sense mediated decay factor Upf1 and triggers degradation of the bound mRNA (Kim et al., 2005; Kim et al., 2007). Stau1 mediated mRNA decay is not a quality control mechanism but rather a *bona fide* mechanism of regulation of gene expression. In contrast, when bound to the 5'UTR of an mRNA, Stau1 can enhance the translational efficiency of this mRNA (Dugre-Brisson et al., 2005).

In this report, we studied the capacity of Stau1 to self-interact and identified molecular determinants involved in this property. *In vitro* and *in vivo* analyses using different techniques such as bioluminescence resonance energy transfert (BRET), yeast two-hybrid assay and co-immunoprecipitations were used to demonstrate that two Stau1 molecules associate to form a head-to-head structure via both dsRNA binding and dsRBD5 self-interaction.

3.3.4. Materials and methods

Materials and methods

Antibodies and reagents

Goat polyclonal anti-GFP antibodies were obtained from Rockland. The monoclonal anti-Stau1 antibody (clone 11C6) was previously described (Dugre-Brisson et al., 2005). Anti-mouse and anti-goat polyclonal antibodies conjugated to horseradish peroxidase were obtained from DakoCytomation. X-gal and imidazole were purchased from Bioshop. Western blot signals were detected using Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences) and were detected with a Fluor-S MultiImager apparatus (Bio-Rad) and quantified with the Quantity One (version 4.5) software (Bio-Rad).

Cell culture, transfection and BRET assay

Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone). Transfections were carried out with the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). BRET experiments were carried out as described (Chatel-Chaix et al., 2007; Chatel-Chaix et al., 2004). Briefly, cells were plated into 12 well plates at 120 000 cells per well. 24 hours later, cells were transfected with the indicated plasmids and BRET assays were performed 24 hours post-transfection in live cells. Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) at room temperature and diluted to 10^6 cells per ml. Coelenterazine H (NanoLight Technology) was added to 90 μ L of cells at a final concentration of 5 μ M. Luminescence (440- to 500-nm) as well as total and transmitted fluorescence (510- to 590-nm) emissions

were measured using a Fusion α -FP apparatus (Perkin-Elmer). The BRET ratio was defined as $[(\text{emission at 510 to 590 nm}) - (\text{emission at 440 to 500 nm}) \times C_f] / (\text{emission at 440 to 500 nm})$, where C_f corresponds to $(\text{emission at 510 to 590 nm}) / (\text{emission at 440 to 500 nm})$ when *Rluc*-fused protein is expressed alone. The total YFP activity/*Rluc* activity ratio reflects the relative levels of activity of the two Stau1 fusion proteins in the cells. The BRET ratio increases with the total YFP activity/*Rluc* activity ratio, since more Stau1-YFP molecules bind to Stau1-*Rluc*. A saturation curve can be drawn when Stau1-*Rluc* becomes saturated by Stau1-YFP molecules, and an optimal BRET ratio can be calculated at saturation for a specific protein-protein interaction. BRET ratios were compared at the same YFP activity/*Rluc* activity ratio. When BRET was carried out in cell extracts, cells were lysed in 200 μ L of lysis buffer (0.1 M Tris-Cl, pH 7.9, 0.5% NonidetP40 and 1mM DTT) and incubated at room temperature for 15 minutes with or without 30 μ g/ml of RNase A (Fermentas).

cDNA constructions

YFP-fused Stau1 mutants (Luo et al., 2002), Stau1-*Rluc* (Chatel-Chaix et al., 2004), Stau1-HA₃ and Stau1 ^{$\Delta 2$} -his₆ plasmids (Wickham et al., 1999) were previously described. Stau1 ^{$\Delta 2$} -*Rluc* and Stau1 ^{$\Delta 5$} -*Rluc* were constructed from Stau1-*Rluc* by the all-around technique. Oligonucleotides used to generate Stau1 ^{$\Delta 2$} -*Rluc* were sense 5'-GAGGTGAATGGAAGAGAATCCGAA-3' and antisense 5'-CATAAGCTTGATATCCTGCAGACG-3'. The oligonucleotides used to construct

Stau1^{Δ5}-Rluc were sense 5'-ATCCCACCGGCTAGAGCCACC-3' and antisense 5'-CTCAGAGGGTCTCGTGAGAGG-3'. To generate the pB42AD-Stau1^N plasmid, the Stau1-HA₃ plasmid was PRC amplified with sense 5'-CAATGCACTCGAGATGTATAAGCCTGTTGACC-3' and antisense 5'-CGGATTACTCGAGTTATGCGGGACTTTGAAACC-3' (underlined: the XhoI sites) oligonucleotides and the resulting fragments were subcloned in frame in the XhoI restriction site of the pB42AD plasmid. The pB42AD-Stau1^C plasmid was PCR amplified with the sense 5'-CTTAATTCTCGAGCCGCAGGCGCAGCCCAC-3' and antisense 5'-CTGAATTCTCGAGTTAGCACCTCCCACACA-3' oligonucleotides (underlined: the XhoI sites). The 4K mutant was constructed from the 2K mutant described in (Dugre-Brisson et al., 2005) by the all-around technique with the following sense and antisense oligos: GCACCAACGCGGCGGTGGCCA and TGGCCACCGCCGCGTTGGTGC. PCR fragments corresponding to dsRBD2,3,4 and 5 of Staufen (see table I) were digested with EcoRI and XhoI enzymes and cloned into pLexA pre-digested with EcoRI and XhoI. PCR fragment corresponding to TBD domain was digested with MunI and XhoI and cloned into pLexA pre-digested with EcoRI and XhoI. Full length hSt was obtained by PCR amplification using primers 5'-GATGCTCGAGATGAACTTGGAAAAAACC-3' and dsRBD5as, and digested with XhoI enzyme. This fragment was then cloned into pB42AD pre-digested with XhoI enzyme. All constructs were sequenced prior to utilization.

Recombinant protein production and purification

Bacterially expressed Stau1-his₆ and neutral endopeptidase (NEP)-his₆ were purified as previously described (Wickham et al., 1999). Aliquots of the purified proteins were stored at -80°C until use. Protein concentration was determined by the BioRad dye reagent and BSA as a standard. For the pull-down assays, Stau1-his₆ and NEP-his₆ (as control) were immobilized on a Ni-NTA-agarose matrix and *in vitro* translated ³⁵S-labelled Stau1 was loaded onto the column. After extensive washings, bound proteins were eluted with 300 mM imidazole and three elution successive fractions were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. In parallel, the *in vitro* translated ³⁵S-Stau1 extract was treated with 20 pg/ml RNase A for 1 hour prior to loading.

Yeast two-hybrid assay

The EGY48 strain was transformed with the pLexA or pB42 plasmids containing the Stau1 fragments of interest. Yeast cells were grown in either synthetic growth media lacking the nutrients indicated or rich media. The quantitative β -galactosidase expression levels were determined by liquid assay using ONPG. To do so, the yeasts were cultured overnight in standard dropout (SD) media containing 2 % galactose, 1 % raffinose and lacking the appropriate nutrients but containing leucine. On the morning cells were diluted 1 to 5 in SD containing 2 % galactose, 1 % raffinose and lacking the appropriate nutrients but without leucine.

Immunoprecipitation

HEK 293T cells were plated at 2.5×10^6 cells per 10 cm plate. 24 hours later cells were transfected with 5 μ g of pcDNA-RSV Stau1⁵⁵-HA₃ and/or 2 μ g of Top-GFP-Stau1⁵⁵. 24 hours post-transfection, cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed with 450 μ L of lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 15 mM EGTA, 100 mM NaCl and 1 mM DTT) on ice for 20 minutes. Lysates were cleared by centrifugation at 17 000 g for 10 minutes. The supernatant was then incubated with or without 30 μ g/ml of RNase A for 10 minutes at 37°C followed by a 1 hour pre-clearing with 15 μ L of 50% protein A-sepharose slurry (Amersham) at 4°C. After centrifugation, the supernatant was incubated with goat polyclonal anti-GFP antibodies (1/300) for 90 minutes at 4°C, then with 20 μ L of 50% protein A-sepharose slurry for 90 minutes at 4°C. Immune complexes were washed three times with the lysis buffer and eluted from the resin by heating at 95°C for 5 minutes in 2X protein loading buffer (125 mM Tris-Cl pH 6.8, 10% glycerol, 3.3% SDS, 0.2M DTT and 0.04% bromophenol blue). Proteins were analysed by SDS-PAGE and Western blotting.

3.3.5. Results

Results

Differentially tagged-Stau1 are found in common complexes *in vivo*

To determine whether Stau1 forms complexes in mammalian cells, we used immunoprecipitation of differentially-tagged Stau1 proteins. HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1-HA₃ and for Stau1-GFP. Co-transfection of plasmids coding for Stau1-HA₃ and for GFP were used as controls. Western blot experiments indicated that the levels of expression of transfected Stau1-HA₃ and Stau1-GFP were similar in all conditions in the cell extracts (Fig. 1). Proteins in the cell extracts were then immunoprecipitated using anti-GFP antibody and co-immunoprecipitated proteins were analysed by western blotting using anti-Stau1 antibody (Fig. 1). In these conditions, Stau1-HA₃ was co-immunoprecipitated with Stau1-GFP. Treatment of the cell extracts with RNase A before immunoprecipitation did not abolish Stau1 interaction. In contrast, Stau1-HA₃ was not immunoprecipitated by anti-GFP when expressed alone or when co-expressed with GFP. These results show that differentially-tagged Stau1 are found in common complexes and that their presence in these complexes is likely not dependent on an RNA substrate.

Stau1 self-associates in live cells

In order to confirm the proximity of Stau1 molecules within a complex, the BRET assay was used. This technique allows for the detection of closely localized proteins. When

a YFP-tagged molecule is in close proximity (≤ 100 Å) to a *Renilla* luciferase (*Rluc*)-tagged molecule as a consequence of protein-protein interaction, resonance energy is transmitted from the *Rluc* to the YFP which in turn emits fluorescence. Quantitative measurement of this fluorescence is used to calculate a BRET signal reflecting the proximity of the tested proteins. Therefore, to perform the BRET experiments, Stau1 was fused to *Rluc* and to YFP. Western blots confirmed the expression and size of the fusion proteins (data not shown). Stau1-*Rluc* and Stau1-YFP were then co-expressed in HEK293T cells. Co-expression of Stau1-*Rluc* and YFP was used as control. Expression of fixed amounts of Stau1-*Rluc* in combination with increasing amounts of either Stau1-YFP or YFP generated BRET saturation curves (Figure 2A) that allowed us to compare BRET ratio at similar ratio of excited YFP activity/*Rluc* activity (Figure 2B). Co-expression of Stau1-*Rluc* and Stau1-YFP produced a strong BRET signal (0.1) in live cells suggesting a close proximity between these two proteins, likely through direct interaction. In contrast, Stau1-*Rluc* only produced a negligible BRET signal (0.01) when co-expressed with YFP, confirming the specificity of the Stau1-*Rluc*/Stau1-YFP BRET signal. The BRET assay was also performed on cell extracts allowing us to determine whether the interaction is sensitive to RNase treatment or not. Cells were lysed and the resulting cell extracts were incubated in the presence or absence of RNase A at room temperature for 15 minutes before fluorescence measurement. There was no significant difference in Stau1-*Rluc*/Stau1-YFP BRET signals between RNase A treated and untreated extracts (Figure 2C).

Direct protein-protein interaction contributes to Stau1 self-association

To further confirm the direct interaction of Stau1 proteins, an *in vitro* pull-down assay was developed. Bacterially expressed and purified Stau1-his₆ was loaded on a Ni-NTA column. A bacterially expressed NEP-his₆ protein was used as control. In vitro synthesized ³⁵S-labeled Stau1 was loaded on the Stau1-his₆ and NEP-his₆ columns. After several washing steps, ³⁵S-labeled Stau1 was eluted from the columns and detected by SDS-PAGE and autoradiography (Figure 3). Whereas ³⁵S-labeled Stau1 was retained on the Stau1-his₆ column, it was absent from the NEP-his₆ column showing that Stau1 interacts with itself in this assay. The same experiment was done in the presence of RNase A (50 µg/ml). In these conditions, ³⁵S-labeled Stau1 still interacted with Stau1-his₆. Altogether, these results suggest that the interaction between two Stau1 proteins involved protein-protein interaction.

RNA-binding activity also contributes to Stau1 self-association in vivo

Our results indicate that protein-protein interaction contributes to Stau1 self-association and that this interaction is resistant to RNase treatment. However, these experiments cannot completely rule out the possibility that an RNA molecule may be required during an initial step that triggers Stau1 self-association or that a linker RNA is protected from RNase A degradation by bound Stau1 molecules. To address this issue, RNA-binding defective Stau1 mutants were fused to YFP and used in the BRET assay described above to address their ability to interact with the wild-type Stau1-Rluc. Mutations

were introduced in Stau1 dsRBD3, a domain shown to carry the major Stau1 RNA-binding activity, and in dsRBD4, a domain carrying a weak RNA-binding activity *in vitro* (Wickham et al., 1999) (Figure 4). Three mutants were generated by either deletion of the complete dsRBD3 (Stau1^{Δ3}-YFP) or through point mutations in amino acids required for RNA binding in dsRBD3 (Stau1^{KK}-YFP) or in both dsRBD3 and dsRBD4 (Stau1^{4K}-YFP). In these mutants, lysines 153 and 154 in dsRBD3 and lysines 256 and 257 in dsRBD4 were mutated to alanines. HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1-Rluc and either one of the mutated fusion proteins. BRET signals were calculated in live cells 24 h post-transfection. Following expression of mutants in dsRBD3 alone (Stau1^{KK} and Stau1^{Δ3}), the BRET ratio was weakly affected being only reduced by about 20% ($77\% \pm 10\%$ and $77,5 \pm 0,9\%$, respectively) as compared to the BRET activity generated with the wild type Stau1-YFP (Figure 5A). When mutations were introduced in both dsRBD3 and dsRBD4 (Stau1^{4K}), the BRET ratio was further reduced to 51,8% ($\pm 0,4\%$) of the one obtained with Stau1-YFP. These results indicate that Stau1 self-association still occurs in live cells in the absence of Stau1 RNA-binding activity, consistent with the *in vitro* assays described above. Nevertheless, RNA-binding activity or intact dsRBD3 and/or dsRBD4 domains is involved in Stau1 self-association and may be helpful to initiate or stabilize protein-protein interaction.

Characterisation of the molecular determinants required for Stau1 self-association

To map the molecular determinants involved in Stau1-Stau1 protein interaction, we first expressed different combinations of wild type and Stau1 deletion mutants (Fig. 4) fused to either *Rluc* or YFP and measured their BRET activity in live cells. When co-expressed with wild type Stau1, Stau1^{Δ2} or Stau1^{Δ5} expression reduced the BRET activity by about 30% and 50%, respectively, as compared to that obtained with wild type Stau1 (Fig. 5B). These results suggest that dsRBD5 is a major determinant involved in the protein-protein aspect of Stau1 self-association. To discriminate between head-to-tail (dsRBD2 interacting with dsRBD5) and head-to-head (dsRBD2 interacting with dsRBD2 and dsRBD5 interacting with dsRBD5) models, we calculated BRET activity following co-expression of several pairs of fusion proteins: Stau1^{Δ5}-*Rluc*/Stau1^{Δ2}-YFP, Stau1^{Δ2}-*Rluc*/Stau1^{Δ2}-YFP, Stau1^{Δ5}-*Rluc*/Stau1^{Δ5}-YFP and Stau1^{Δ2}-*Rluc*/Stau1^{Δ5}-YFP. As shown in Figure 5C, co-expression of Stau1^{Δ2}-*Rluc* and Stau1^{Δ2}-YFP generated a BRET signal that was similar to that obtained with Stau1-*Rluc* and Stau1-YFP suggesting that the loss of dsRBD2 does not impair Stau1 self-association. In contrast, co-expression of Stau1^{Δ5}-*Rluc* and Stau1^{Δ5}-YFP showed a BRET activity that is reduced to 51,3% ($\pm 0,1\%$) consistent with a significant role of dsRBD5 in Stau1 association. Finally, BRET signals generated by the co-expression of the Stau1^{Δ5}-*Rluc*/Stau1^{Δ2}-YFP or Stau1^{Δ2}-*Rluc*/Stau1^{Δ5}-YFP pairs were highly reduced being only about 25% (32,8% $\pm 0,2\%$ and 24,3% $\pm 0,4\%$, respectively) of the BRET activity generated by the Stau1 wild-type pair (Fig. 5C). Consistently, a Stau1 mutant that only carried the dsRBD4 and tubulin-binding domains (RBD4/TBD) did not generate BRET signal when expressed with wild-type Stau1 (Fig.

5D). All Stau1 mutants used for the BRET assays were properly localized in the cell (data not shown). Altogether, these results are consistent with a head-to-head model where the dsRBD2 and dsRBD5 of a monomer interact with their corresponding domain in another Stau1 monomer (see figure 6).

dsRBD5 is involved in protein interaction in the yeast two-hybrid system

To confirm the involvement of dsRBD5 and dsRBD2 in protein interaction, the yeast two-hybrid system was used. The full-length Stau1 protein was fused to the B42 transcription activator whereas each of the 4 dsRBDs of Stau1 and the tubulin-binding domain (TBD) were individually fused to the LexA DNA-binding domain. After selection for the presence of both plasmids in the yeast strains, cells were plated on a Ura⁻, His⁻, Trp⁻, Leu⁻ medium with galactose and X-Gal. Our results showed that only the dsRBD2- and dsRBD5-LexA fusion proteins grew on the selective medium and produced β -galactosidase activity (Fig. 7A). Therefore, both dsRBD2 and dsRBD5 can interact with the full-length Stau1 protein in this assay. To determine the domain(s) of interaction, Stau1^N (dsRBD2/3/4) and Stau1^C (dsRBDTBD/5) domains were fused to the B42 protein and tested for their capacity to interact with dsRBD2-LexA and dsRBD5-LexA. As shown in figure 7B, dsRBD5 was able to interact with both Stau1^N- and Stau1^C. In contrast, dsRBD2 did not produce β -galactosidase activity above background level in these conditions. In an attempt to more precisely pinpoint domains of interaction, dsRBD2-LexA/dsRBD5-B42 and dsRBD5-LexA/dsRBD2-B42 interactions were tested in the two-hybrid system. No

reproducible and clear results were generated (data not shown) suggesting that these short domains are not sufficient for hetero-association.

3.3.6. Discussion

Discussion

Many RNA-binding proteins are known to function as homo-dimers (Hitti et al., 2004; Lemaire et al., 2005; Niessing et al., 2004). Our results indicate that Stau1 protein self-associates to form dimers and/or oligomers in vivo and in vitro. Both Stau1 RNA-binding activity and protein-protein interaction contribute to Stau1 self-association, each mechanism being responsible for about 50% of the association. This is consistent with previous studies in which dsRBPs form dimers through both dsRBDs and other domains not involved in RNA-binding (Daher et al., 2001; Lamontagne et al., 2000; Lebeau et al., 2008a; Peters et al., 2001; Valente and Nishikura, 2007).

The BRET assays indicate that Stau1 RNA binding activity (via dsRBD3 and dsRBD4) contributes to Stau1 self-association (Fig. 5A). However, it is not essential since BRET activity, although reduced, is still detectable when RNA-binding deficient Stau1 mutants are expressed in vivo and since Stau1 self-association can be detected in vitro using purified proteins in the presence of RNase. Several biochemical studies (Nanduri et al., 2000) as well as NMR and crystallographic structures of bacterially expressed dsRBDs (Bycroft et al., 1995; Kharrat et al., 1995; Nanduri et al., 2000; Ramos et al., 2000; Ryter and Schultz, 1998) indicate that RNA-binding competent dsRBDs behave as monomeric forms. Therefore, it is unlikely that dsRBD3 and dsRBD4 establish protein-protein interaction that contributes to Stau1 self-interaction. This observation that the protein interactions occur via domains that do not bind RNAs in vitro (Wickham et al., 1999)

suggests that dsRBD3 and dsRBD4 are free to interact with dsRNA and the tubulin-binding domain with the cytoskeleton. Stau1 RNA-binding activity may facilitate the encounter of two Stau1 monomers on a dsRNA structure and then facilitate the recognition, formation and/or maintenance of the protein-protein interaction mediated by dsRBD5 and dsRBD2.

NMR and crystallographic structures generated with isolated dsRBDs in the presence of double-stranded RNA (Nanduri et al., 2000; Ryter and Schultz, 1998) reveal that single dsRBD interacts with two successive minor grooves and across the intervening major groove on one face of the dsRNA helix. They also show that two dsRBDs can bind a single RNA molecule forming a head-to-tail structure in which the two dsRBDs are rotated by 90° around the long axis of the RNA relative to each other (Nanduri et al., 2000; Ryter and Schultz, 1998). This is relevant since several dsRBPs such as PKR and Stau1 contain two RNA-binding competent dsRBDs that are separated by a short linker. It was proposed that the four dsRBDs of two PKR proteins can wrap around dsRNA molecule in an end-to-end fashion to facilitate PKR dimerization and subsequent activation of the kinase domain (Nanduri et al., 2000). This precise spatial configuration of dsRBDs on dsRNA is likely to trigger the proper orientation of monomeric proteins in the dimer. Crystallographic studies using the activated kinase domain of PKR revealed that the two molecules are back-to-back in a parallel orientation (Dar et al., 2005; Dey et al., 2005). Our data suggest that two Stau1 monomers are also positioned in a head-to-head conformation within the complexes. It is likely that the positioning of dsRBD3 and dsRBD4 on a dsRNA molecule determines Stau1 monomer orientation in the complex as observed for PKR. Although the minimal length on

a dsRNA motif that is required for binding of Staufeu's dsRBD3 was shown to be 12 bp (Ramos et al., 2000), the region involved in binding two adjacent dsRBDs was shown to span 16 bp (Ryter and Schultz, 1998). This is consistent with the identified Stau1 RNA-binding motif in Arf1 mRNA that forms a double-stranded stem of 19 bp (Kim et al., 2007). Based on these observations (Kim et al., 2007; Nanduri et al., 2000; Ryter and Schultz, 1998), a model is proposed in which Stau1 self-association first occurs through RNA-binding activity, association that is reinforced by protein-protein interactions via dsRBD5. In this model, two Stau1 proteins wrap around dsRNA using the RNA-binding domains dsRBD3 and dsRBD4 (Fig. 8). This arrangement permits protein-protein interactions between two dsRBD5 monomers (Fig. 8). It is possible that dsRBD2-dsRBD2 interaction stabilizes this conformation.

The yeast two-hybrid assay indicates that, in addition to the proposed homophilic binding of dsRBD5, heterophilic interaction between dsRBD5 and the N-terminal end of Stau1 are also possible. This observation opens the interesting possibility that Stau1 structure and/or functions are regulated by intra-molecular interaction between an N-terminal domain and dsRBD5.. A similar regulatory mechanism has been described for Rnt1p, a member of the dsRBP family in yeast, in which an N-terminal domain established intra-molecular interaction with the C-terminal dsRBD (Lamontagne et al., 2000). Competition between intra-molecular Nter-dsRBD5 interaction and inter-molecular homophilic binding of dsRBD5 and dsRBD2 may control Stau1 self-association and, as a consequence, Stau1 structure/functions.

What could be the relevance of Stau1 self-association for Stau1 functions? First, several Stau1 isoforms are generated via alternative splicing (Wickham et al., 1999). A first mechanism of regulation could be related to the capacity of Stau1 isoform to form heterodimers. Of particular interest, Stau1ⁱ contains an insertion of 6 amino acids in dsRBD3 that impairs its ability to bind RNA (Duchaine et al., 2000; Monshausen et al., 2001). It was shown that the association between Stau1ⁱ and Stau1 forms RNA-binding defective particles (Duchaine et al., 2000). Therefore, the relative ratio of Stau1 and Stau1ⁱ in the cell modulates the RNA content of Stau1 RNPs and influences the availability of RNA-binding competent Stau1 complexes. A second level of regulation via self-association may modulate Stau1 functions directly. It is documented that dimer formation is necessary for the functions of other members of the dsRBP family (Daher et al., 2001; Hitti et al., 2004; Lemaire et al., 2005; Valente and Nishikura, 2007). Functions such as mRNA transport and localization (Kanai et al., 2004), nuclear transit (Martel et al., 2006), translation regulation (Dugre-Brisson et al., 2005), interaction with the cytoskeleton (Wickham et al., 1999) and Stau1-mediated mRNA decay (Kim et al., 2005; Kim et al., 2007) could be regulated via self-association. A third level of Stau1 regulation through self-association may involve the formation of large complexes. In neurons, biochemical studies showed that Stau1 is present in large complexes that contain mRNA and protein cofactors (Mallardo et al., 2003). Larger complexes also contained ribosomes. In contrast, relatively few Stau1 molecules migrated in fractions corresponding to complexes of the size of Stau1 monomers or dimers suggesting that Stau1 forms oligomers with RNAs and other protein factors. Interestingly,

three of the known Stau1 RNA substrates are known to form homo-dimers: *bicoid* and *oskar* mRNAs in *Drosophila* (Chekulaeva et al., 2006; Ferrandon et al., 1997) and HIV-1 genomic RNA in humans (Darlix et al., 1990). Therefore, large complexes may be formed through Stau1 and/or RNA self-association, complexes that are required for proper mRNA metabolism.

So far, the only structural analyses on Staufen were performed on a single dsRBD of *Drosophila* Staufen (Bycroft et al., 1995; Ramos et al., 2000). It would be interesting to define the structure of the full length Stau1 proteins in the presence or absence of dsRNA. The relative position of the adjacent dsRBDs and the association of functional domains should be clarified.

3.3.7. Acknowledgements

Acknowledgements

We thank the technical assistance of Francis Goyette, Phu Vinh On, Monique Vasseur, Gabriel Lapointe, Louise Cournoyer and Linda Huang. CM, TD and SDB were supported by studentships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and KB received studentships from the Fonds de Recherche en Santé du Québec. This work was supported by a grant from NSERC to LDG.

3.3.8. Figures Legends

Figures Legends

Figure 1. Stau1 proteins form complexes *in vivo*. HEK 293T cells were mock transfected (Lanes 1 and 6), transfected with a Stau1-HA₃ expressor (Lanes 2 and 7), co-transfected with Stau1-HA₃ and GFP expressors (Lanes 3 and 8) or co-transfected with Stau1-HA₃ and Stau1-GFP expressors (lanes 4, 5, 9 and 10). Total lysates (Lanes 1 to 5) and anti-GFP immunoprecipitates (lanes 6 to 10) are shown. Cells lysates were also treated with RNase prior to immunoprecipitation (lanes 5, 10). After separation of the proteins by SDS-PAGE and transfer on membrane, the membrane was cut and the upper and lower parts were analysed by western blotting using anti-Stau1 (upper panel) and anti-GFP (lower panel) antibodies, respectively. * : non-specific IgG bands.

Figure 2. Stau1 self-associates in live cells as measured by BRET. (A) HEK 293T cells were co-transfected with constant amounts of Stau1-Rluc and various amounts of either Stau1-YFP or YFP expressors. The graph is a representative example of the saturation curves performed to provide evidence for a specific interaction between the proteins in live cells. BRET ratios were defined as described in Materials and Methods and plotted as a function of the excited YFP activity to total *Renilla* luciferase activity ratio. This method allows comparison of BRET ratios when Stau1-YFP and YFP are expressed at the same levels. (B) From data generated in (A), histogram comparison of BRET ratios at saturation calculated at the same excited YFP activity/Rluc activity. n = 3. Error bars correspond to standard deviation. (C) HEK 293T cells were co-transfected with Stau1-Rluc and Stau1-

YFP expressors. Cell lysates were incubated in the presence or absence of RNase A at room temperature for 15 minutes. BRET ratios for Stau1-Rluc and Stau1-YFP interaction in the presence (+) or absence (-) of RNase are shown. BRET ratio of the sample not treated with RNase A was arbitrarily fixed to 1. n = 3. Error bars correspond to standard deviation.

Figure 3. Direct Stau1 interaction as detected by a pull down assay. Bacterially expressed his₆-Stau1 or his₆-NEP (as control) fusion proteins were fixed on a Ni-NTA column and extensively washed. In vitro synthesized ³⁵S-Stau1 was loaded onto the columns. Columns were washed and then ³⁵S-Stau1 was eluted and collected in three successively fractions (lanes 1,2,3). The labelled protein was separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. In parallel, his₆-Stau1, his₆-NEP and ³⁵S-Stau1 preparations were treated with RNase A before loading onto the columns. An aliquot of ³⁵S-Stau1 was also loaded on the gel (lane: load) to control for its synthesis and size.

Figure 4. Schematic representation of the Stau1 mutants. Stau1 and Stau1 mutants are depicted. Black and grey boxes represent the double-stranded RNA-binding domains with major (dsRBD3) and minor (dsRBD4) dsRNA-binding activity, respectively; white boxes represent domains with no demonstrated RNA-binding activity (dsRBD2 and dsRBD5) and the hatched boxes represent the tubulin binding domain (TBD). Stau1^{KK}, mutations K153A and K154A in dsRBD3. Stau1^{4K} mutant, mutations K153A and K154A in dsRBD3 and K256A and K257A in dsRBD4.

Figure 5. Stau1 proteins self-associate via their dsRBDs 2 and dsRBD5. Relative BRET ratios were calculated as in figure 2. **(A)** Relative BRET ratio of Stau1 and Stau1 mutants in their RNA-binding domains. HEK 293T cells were co-transfected with Stau1-*Rluc* and either Stau1-YFP, Stau1^{Δ3}-YFP, Stau1^{4K}-YFP or Stau1^{KK}-YFP expressors. The BRET ratio generated with Stau1-*Rluc* and Stau1-YFP was arbitrarily fixed to 1. *n* = 3. **(B)** Relative BRET ratios of Stau1 expressed along with Stau1 deletion mutants. Different combinations of Stau1 and Stau1 deletion mutants fused to either *Rluc* or YFP were co-expressed as indicated. The BRET ratio generated with Stau1-*Rluc* and Stau1-YFP was arbitrarily fixed to 1. *n* = 3. **(C)** Relative BRET ratios of Stau1 deletion mutants. Different combinations of Stau1 deletion mutants fused to either *Rluc* or YFP were co-expressed as indicated. The BRET ratio generated with Stau1-*Rluc* and Stau1-YFP was arbitrarily fixed to 1. *n* = 3. **(D)** Relative BRET ratios of the Stau1 deletion mutant 4-TBD expressed with Stau1. The BRET ratio generated with Stau1-*Rluc* and Stau1-YFP was arbitrarily fixed to 1. *n* = 3. Error bars correspond to standard deviation.

Figure 6. Summary of the BRET ratios in relation to two putative models of Stau1 self-association. The left side and right sides of the figure schematize the head-to-head and the head-to-tail models of interaction between two Stau1 molecules. In the middle, BRET ratios obtained with each pair of molecules are indicated. The best model to explain our results is the head-to-head model in which Stau1 RNA-binding activity and RNA-

independent homophilic binding of dsRBD2 and of dsRBD5 contribute to Stau1 self-association. The color code is described in figure 4.

Figure 7. Protein-protein interaction as measured by the yeast two-hybrid system. (A)

Yeast cells were co-transformed with a plasmid coding for Stau1-B42 and different expressors of Stau1 domains, as indicated. Cells were screened for growth on selective medium and β -galactosidase expression. Stau1-B42 interacts (+) with Stau1 dsRBD2 and dsRBD5 but not (-) with dsRBD3, dsRBD4 or TBD fused to LexA in a two-hybrid assay.

(B) Yeast cells were co-transformed with plasmids coding for either the N- or C-terminal half of Stau1 fused to B42 and for dsRBD2 or dsRBD5 fused to LexA and quantitative β -galactosidase assay in liquid following cell growth in minimal medium were carried. β -galactosidase activity is shown as standard Miller units. Error bars correspond to standard error of the mean (SEM). *, Student's paired t test $p \leq 0,05$.

Figure 8. Schematic representation of the putative interaction between Stau1 dimer and double-stranded RNA.

According to structural studies generated with PKR and XlrpA dsRBDs (Nanduri et al., 2000; Ryter and Schultz, 1998), Stau1 dsRBD3 and dsRBD4 could bind dsRNA in minor grooves over a 16 pb region in a head-to-tail orientation structure in which the two dsRBDs are rotated by 90° around the long axis of the RNA relative to each other. The other Stau1 monomer could bind dsRNA in a similar way leading to two molecules of Stau1 that wrap around the RNA molecule in an end-to-

end orientation. This organization allows self-association of the two dsRBD2 and the two dsRBD5 domains, respectively, in a head-to-head orientation.

3.3.9. References

References

- 1 Marianayagam, N. J., Sunde, M. and Matthews, J. M. (2004) The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci.* **29**, 618-625
- 2 Doyle, M. and Jantsch, M. F. (2002) New and old roles of the double-stranded RNA-binding domain. *J Struct Biol.* **140**, 147-153
- 3 Lunde, B. M., Moore, C. and Varani, G. (2007) RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 479-490
- 4 Ryter, J. M. and Schultz, S. C. (1998) Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J.* **17**, 7505-7513
- 5 Daher, A., Longuet, M., Dorin, D., Bois, F., Segeral, E., Bannwarth, S., Battisti, P. L., Purcell, D. F., Benarous, R., Vaquero, C., Meurs, E. F. and Gatignol, A. (2001) Two dimerization domains in the trans-activation response RNA-binding protein (TRBP) individually reverse the protein kinase R inhibition of HIV-1 long terminal repeat expression. *J Biol Chem.* **276**, 33899-33905
- 6 Peters, G. A., Hartmann, R., Qin, J. and Sen, G. C. (2001) Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. *Mol Cell Biol.* **21**, 1908-1920
- 7 Valente, L. and Nishikura, K. (2007) RNA binding-independent dimerization of adenosine deaminases acting on RNA and dominant negative effects of nonfunctional subunits on dimer functions. *J Biol Chem.* **282**, 16054-16061
- 8 Micklem, D. R., Adams, J., Grunert, S. and St Johnston, D. (2000) Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J.* **19**, 1366-1377
- 9 Duchaine, T. F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M. A. and DesGroseillers, L. (2002) Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci.* **115**, 3285-3295
- 10 Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I. R. and DesGroseillers, L. (1999) Mammalian staufer is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol.* **19**, 2220-2230
- 11 DesGroseillers, L. and Lemieux, N. (1996) Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* **36**, 527-529
- 12 Buchner, G., Bassi, M. T., Andolfi, G., Ballabio, A. and Franco, B. (1999) Identification of a novel homolog of the *Drosophila* staufer protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics.* **62**, 113-118
- 13 Kiebler, M. A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R. M., Ortin, J. and Dotti, C. G. (1999) The mammalian staufer protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci.* **19**, 288-297

- 14 Marion, R. M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C. and Ortin, J. (1999) A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol.* **19**, 2212-2219
- 15 Kanai, Y., Dohmae, N. and Hirokawa, N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron.* **43**, 513-525
- 16 Lebeau, G., Maher-Laporte, M., Topolnik, L., Laurent, C. E., Sossin, W., Desgroseillers, L. and Lacaille, J. C. (2008) Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol*
- 17 Kim, Y. K., Furic, L., Parisien, M., Major, F., DesGroseillers, L. and Maquat, L. E. (2007) Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *EMBO J.* **26**, 2670-2681
- 18 Kim, Y. K., Furic, L., Desgroseillers, L. and Maquat, L. E. (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell.* **120**, 195-208
- 19 Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A. J. and DesGroseillers, L. (2005) Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res.* **33**, 4797-4812
- 20 Chatel-Chaix, L., Abrahamyan, L., Frechina, C., Mouland, A. J. and DesGroseillers, L. (2007) The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *J Virol.* **81**, 6216-6230
- 21 Chatel-Chaix, L., Clement, J. F., Martel, C., Beriault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L. and Mouland, A. J. (2004) Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol.* **24**, 2637-2648
- 22 Luo, M., Duchaine, T. F. and DesGroseillers, L. (2002) Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem J.* **365**, 817-824
- 23 Niessing, D., Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Singer, R. H. and Burley, S. K. (2004) She2p is a novel RNA binding protein with a basic helical hairpin motif. *Cell.* **119**, 491-502
- 24 Hitti, E. G., Sallacz, N. B., Schoft, V. K. and Jantsch, M. F. (2004) Oligomerization activity of a double-stranded RNA-binding domain. *FEBS Lett.* **574**, 25-30
- 25 Lemaire, P. A., Lary, J. and Cole, J. L. (2005) Mechanism of PKR activation: dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA. *J Mol Biol.* **345**, 81-90
- 26 Lamontagne, B., Tremblay, A. and Abou Elela, S. (2000) The N-terminal domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage. *Mol Cell Biol.* **20**, 1104-1115

- 27 Nanduri, S., Rahman, F., Williams, B. R. and Qin, J. (2000) A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *EMBO J.* **19**, 5567-5574
- 28 Bycroft, M., Grunert, S., Murzin, A. G., Proctor, M. and St Johnston, D. (1995) NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufer protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *EMBO J.* **14**, 3563-3571
- 29 Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D. R., Proctor, M. R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D. and Varani, G. (2000) RNA recognition by a Staufer double-stranded RNA-binding domain. *EMBO J.* **19**, 997-1009
- 30 Kharrat, A., Macias, M. J., Gibson, T. J., Nilges, M. and Pastore, A. (1995) Structure of the dsRNA binding domain of *E. coli* RNase III. *EMBO J.* **14**, 3572-3584
- 31 Dar, A. C., Dever, T. E. and Sicheri, F. (2005) Higher-order substrate recognition of eIF2 α by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell.* **122**, 887-900
- 32 Dey, M., Cao, C., Dar, A. C., Tamura, T., Ozato, K., Sicheri, F. and Dever, T. E. (2005) Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2 α substrate recognition. *Cell.* **122**, 901-913
- 33 Monshausen, M., Putz, U., Rehbein, M., Schweizer, M., DesGroseillers, L., Kuhl, D., Richter, D. and Kindler, S. (2001) Two rat brain staufer isoforms differentially bind RNA. *J Neurochem.* **76**, 155-165
- 34 Duchaine, T., Wang, H. J., Luo, M., Steinberg, S. V., Nabi, I. R. and DesGroseillers, L. (2000) A novel murine Staufer isoform modulates the RNA content of Staufer complexes. *Mol Cell Biol.* **20**, 5592-5601
- 35 Martel, C., Macchi, P., Furic, L., Kiebler, M. A. and Desgroseillers, L. (2006) Staufer1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem J.* **393**, 245-254
- 36 Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C. and Kiebler, M. A. (2003) Isolation and characterization of Staufer-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 2100-2105
- 37 Chekulaeva, M., Hentze, M. W. and Ephrussi, A. (2006) Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles. *Cell.* **124**, 521-533
- 38 Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E. and Nusslein-Volhard, C. (1997) RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUER ribonucleoprotein particles. *EMBO J.* **16**, 1751-1758
- 39 Darlix, J. L., Gabus, C., Nugeyre, M. T., Clavel, F. and Barre-Sinoussi, F. (1990) Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J Mol Biol.* **216**, 689-699

3.3.10. Tables and figures

Table I : primers used for PCR amplification of hSt1 domains

<u>domain</u>	<u>orientation</u>	<u>Restriction</u> <u>site</u>	<u>sequence</u>
dsRBD2	sens	EcoRI	TAGATATC <u>GAATTC</u> GCCGCCATGGGATACCCATTTCAG
	antisens	XhoI	TATA <u>CTCGAG</u> GATATCCAGGATCCTCAA
dsRBD3	sens	EcoRI	TAGATATC <u>GAATTC</u> GCCGCCATGGGAAAATCTGAAATAAGT
	antisens	XhoI	TATA <u>CTCGAG</u> GATATCAACTGCAGTGCAGG
dsRBD4	sens	EcoRI	TAGATATC <u>GAATTC</u> GCCGCCATGGGAAATCCGATTAGC
	antisens	XhoI	TATA <u>CTCGAG</u> GATATCAAGGATCTCCAG
dsRBD5	sens	EcoRI	TAGATATC <u>GAATTC</u> GCCGCCATGGGACCCTCTGAGCAA
	antisens	XhoI	TATA <u>CTCGAG</u> GATATCGCACCTCCCACACAC
TBD	sens	MunI	TAGATATC <u>CAATTG</u> GCCGCCATGGGAAAACCCGCACT
	antisens	XhoI	TATA <u>CTCGAG</u> GATATCGGCAGTTACCGTGGC

Figure 1

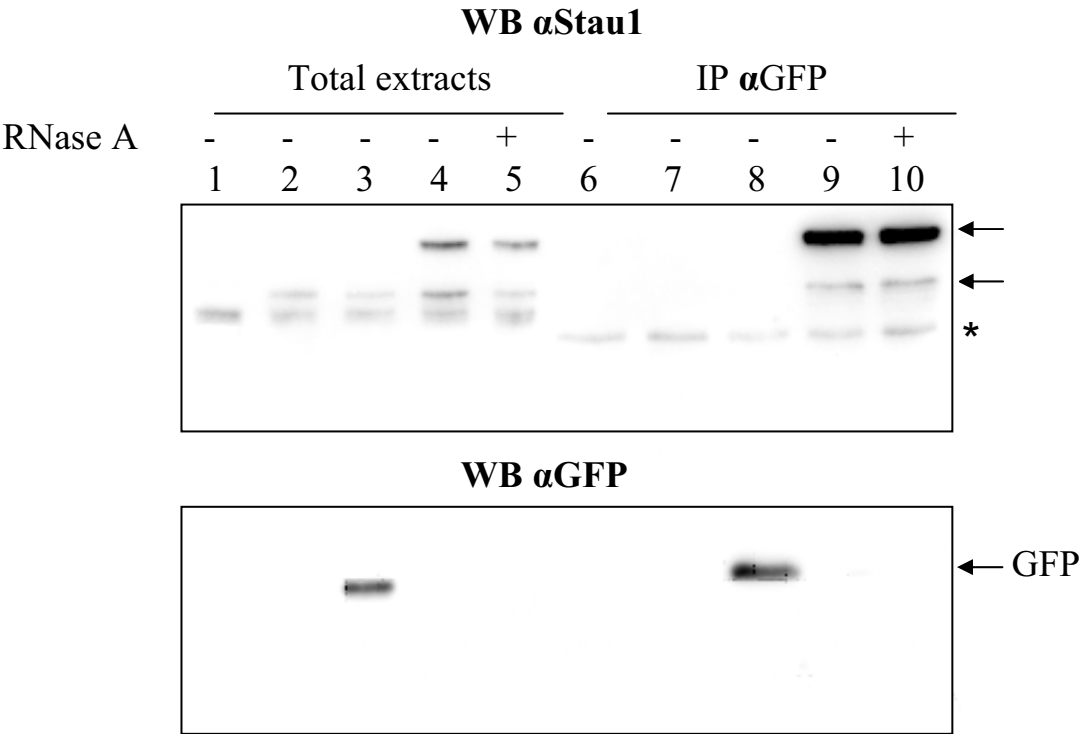


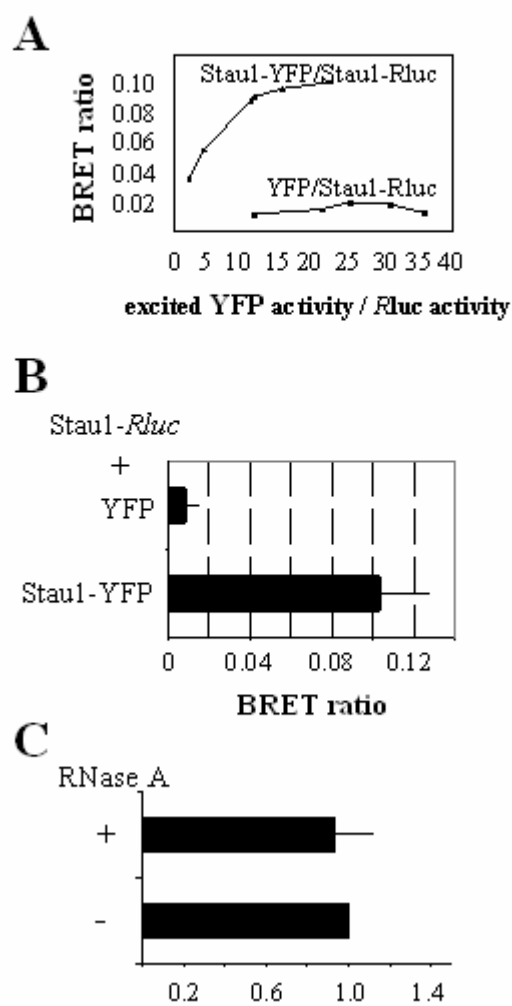
Figure 2

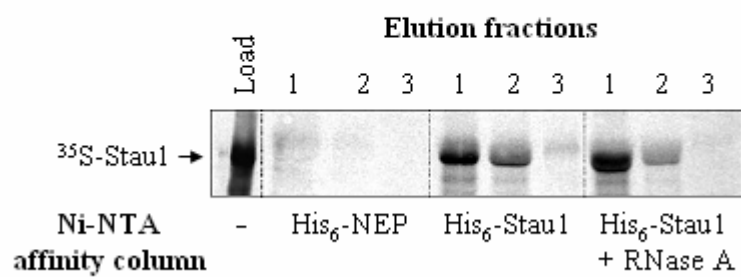
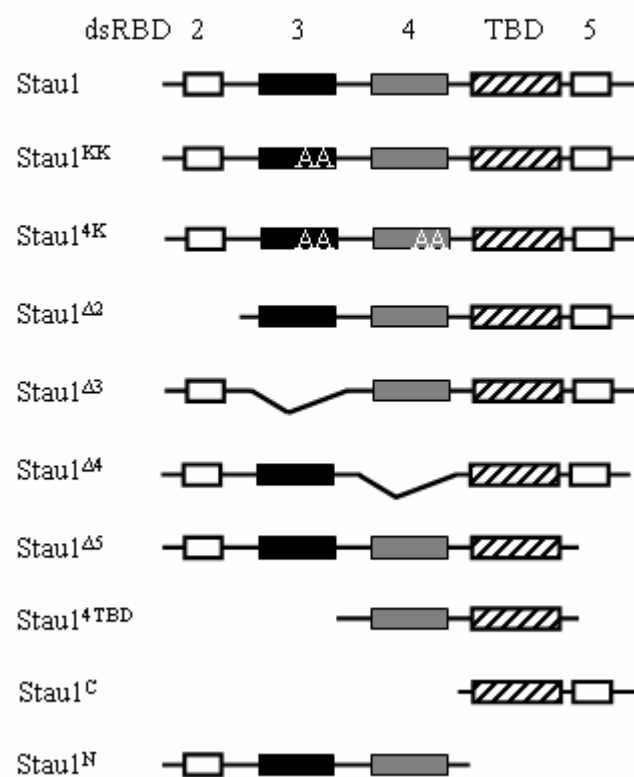
Figure 3

Figure 4

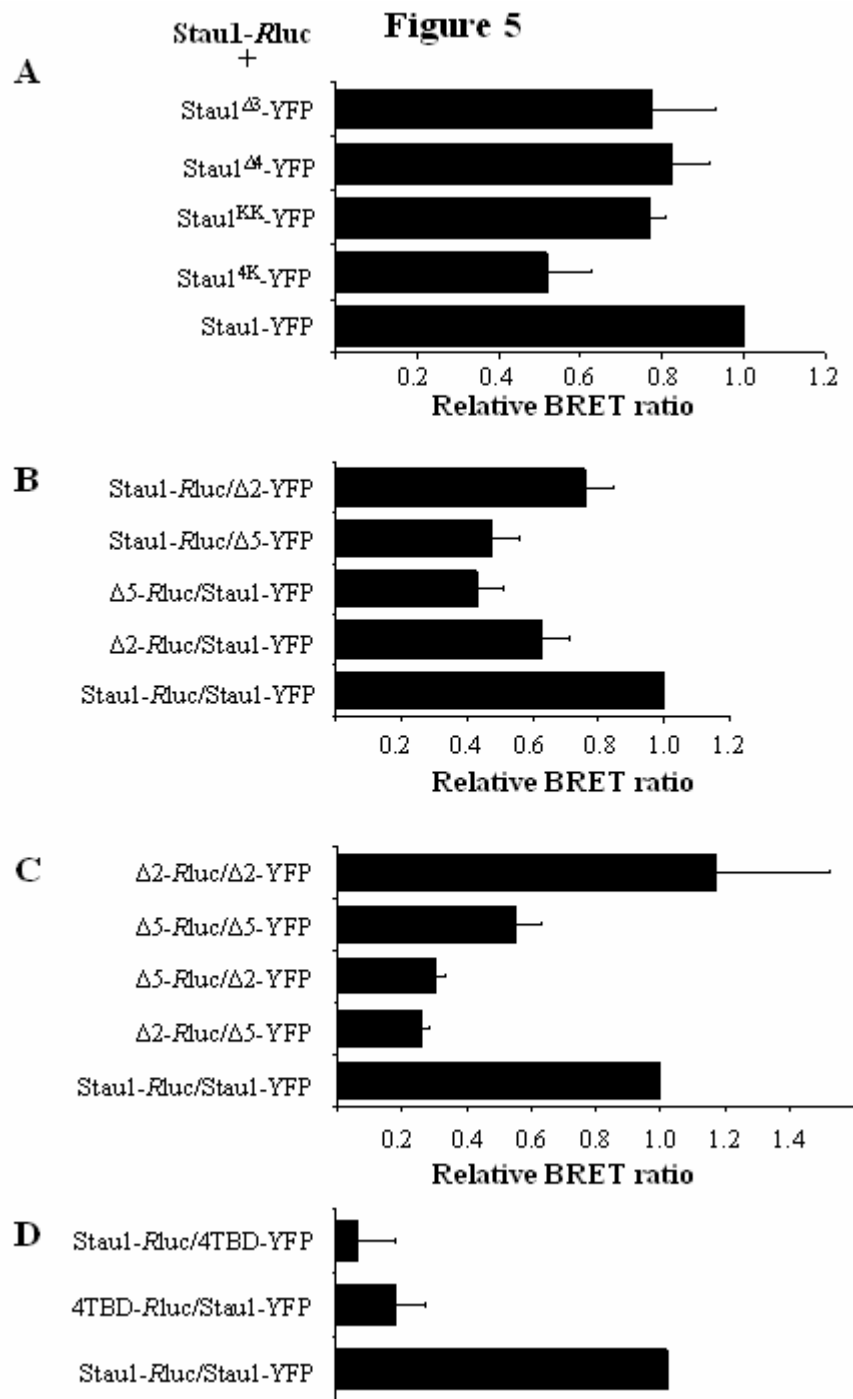


Figure 6

Figure 7

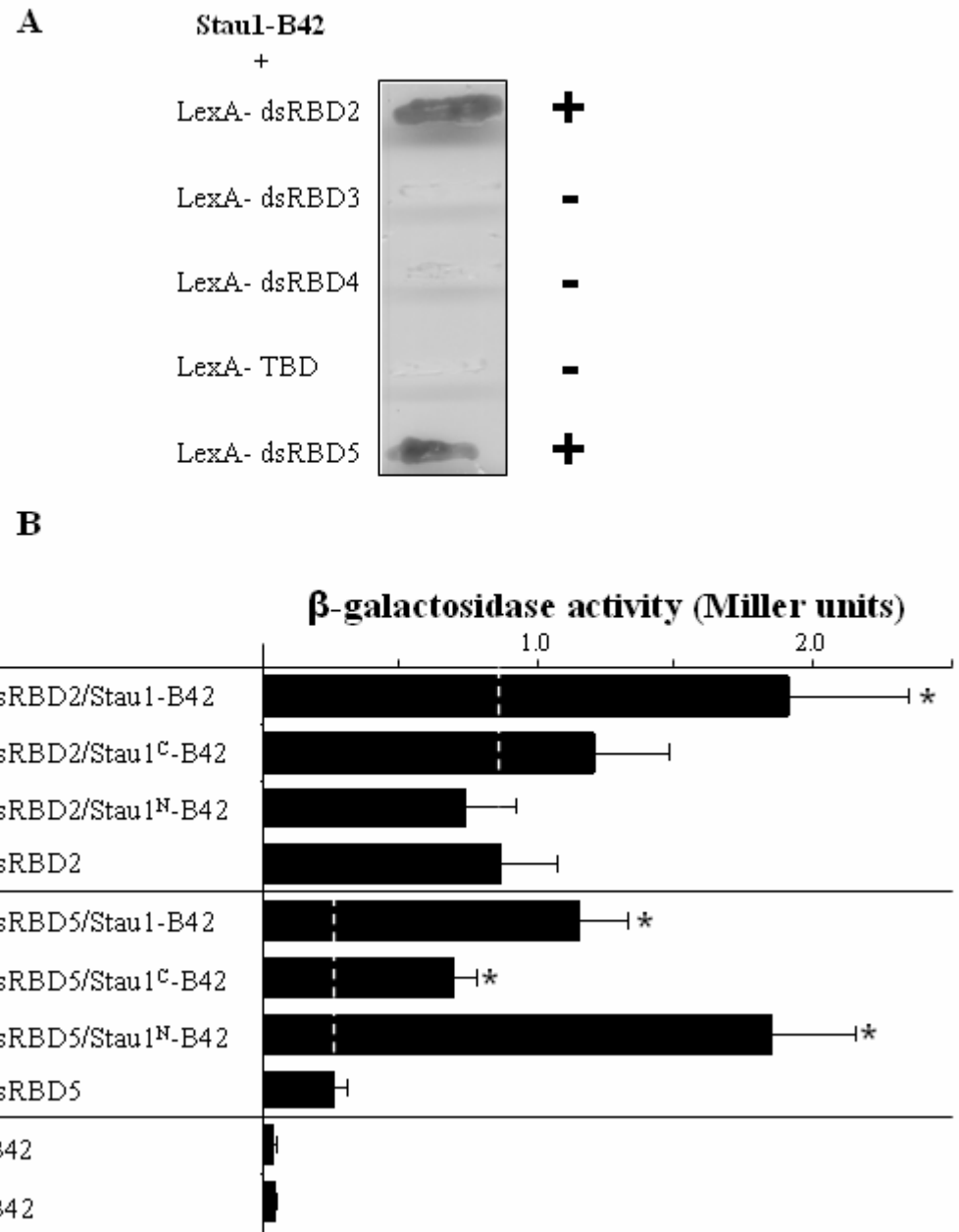
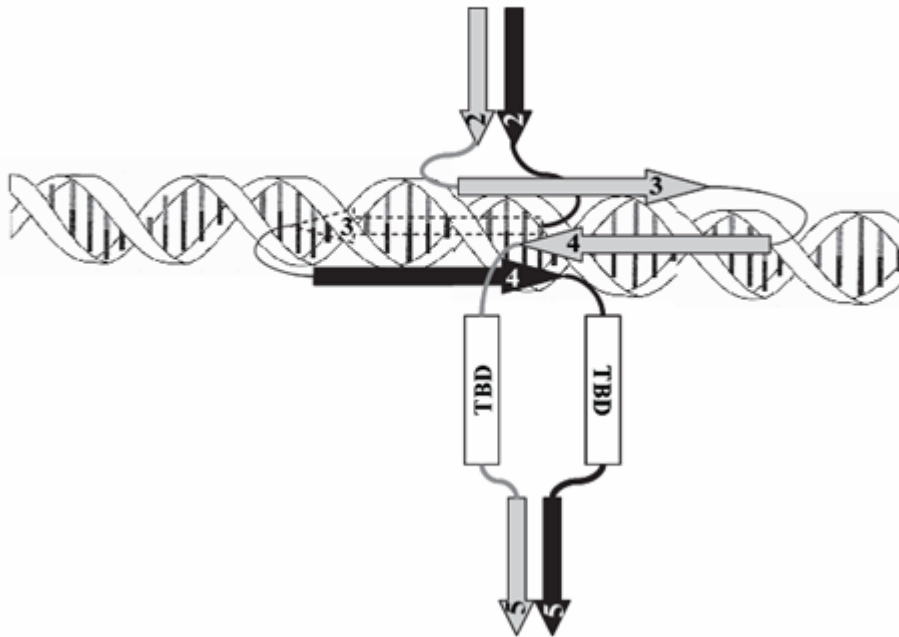


Figure 8

4. Discussion

Les résultats présentés dans cette thèse ont permis de mettre au jour une nouvelle fonction cellulaire de la protéine Staufen1 humaine ainsi qu'un mécanisme pouvant potentiellement réguler l'activité de cette dernière. Ces données viennent souligner une fois de plus l'importance de Stau1 au sein de la cellule et permettent l'ouverture de nouvelles voies d'études afin de mieux comprendre les mécanismes menant à l'accomplissement des activités cellulaires de Stau1. Certains des points discutés dans cette section ont été traités dans les articles présentés dans la section Résultats et seront donc approfondis.

4.1. Le mécanisme de régulation de la traduction par Stau1

Une question intéressante à élucider est le mécanisme employé par Stau1 pour stimuler la traduction d'un ARN messager lorsqu'il est lié à sa région 5'UTR. Dans l'article 1, plusieurs mécanismes potentiels ont été testés. Il semble donc qu'une inhibition ou une compétition avec la kinase PKR ne soit pas à l'origine de la stimulation traductionnelle du rapporteur TAR-Rluc. Également, tel que prévu, Stau1 n'a pas démontré d'activité hélicase efficace afin de défaire des structures d'ARN double-brin, à tout le moins *in vitro*. Par contre, en se fiant à la Figure 8 de l'article 1, on peut suggérer que la stimulation a lieu au niveau de l'initiation de la traduction. En effet, le messenger TAR-Rluc n'est que faiblement représenté dans les fractions de polysomes lourds et se retrouve principalement avec les monosomes ou les polysomes légers. Ce profil est typique d'un messenger dont l'initiation traductionnelle n'est pas efficace. En effet, le chargement des ribosomes sur le messenger étant plus ardu, une proportion appréciable des ARNm ne porteront qu'un seul ou que

quelques ribosomes. Le fait que le rôle traductionnel de Stau1 se fasse au niveau de l'initiation de la traduction est tout à fait en accord avec la littérature où il a été démontré depuis un bon moment que l'initiation est l'étape limitante de la traduction (Kapp and Lorsch, 2004).

4.1.1. Mise au jour du mécanisme

Au cours des dernières années, nous avons tenté de préciser le mécanisme permettant à Stau1 de stimuler la traduction d'un ARN messenger. La première hypothèse que nous avons testée était le recrutement d'une ARN hélicase par Stau1 afin de défaire la structure double-brin présente en 5'UTR du messenger. En nous basant sur les partenaires connus de Stau1, nous avons testé deux hélicases. Dans un premier temps, des essais avec la RNA Helicase A (RHA) n'ont pas permis d'obtenir des résultats intéressants. En effet, les données que nous avons obtenues ont montré que l'expression de la RHA ne modulait pas l'activité traductionnelle de Stau1 envers le rapporteur TAR-Rluc (SDB et LDG, données non publiées). Quand il fut déterminé que le facteur du NMD Upf1 interagissait avec Stau1, nous avons également testé l'influence de cette protéine sur l'activité de stimulation traductionnelle de Stau1. Effectivement, Upf1 possède une activité ARN hélicase (Chamieh et al., 2008; Czaplinski et al., 1995), ce qui en faisait un candidat intéressant, d'autant plus qu'une étude a montré que Upf1 peut stimuler la traduction d'un messenger lorsqu'il est lié à la région codante (Nott et al., 2004). Par contre, les résultats obtenus en surexprimant ou en sous-exprimant Upf1 à l'aide de siRNAs n'ont pas permis

de déceler de changement dans la capacité de Stau1 à stimuler la traduction du messenger SBS-Rluc (SDB et LDG, données non publiées). Il semblerait donc que ni Upf1 ni RHA ne soient la clé du mécanisme recherché. Par contre, on ne peut toujours pas exclure, pour le moment, que Stau1 recrute un de ses partenaires protéiques sur une structure d'ARN double-brin afin de la défaire, permettant ainsi une initiation plus efficace de la traduction. L'identification de nouveaux partenaires de Stau1 permettra peut-être de trouver une autre ARN hélicase qui pourrait s'avérer être le partenaire recherché.

Une autre possibilité permettant d'expliquer l'effet traductionnel de Stau1 au niveau de l'initiation de la traduction serait une stimulation indépendante de la coiffe du messenger. En effet, Stau1, cofractionnant avec la sous-unité 40S du ribosome dans un gradient de saccharose, pourrait recruter celle-ci directement sur le messenger permettant ainsi une initiation plus efficace. Nous avons testé cette hypothèse en construisant un rapporteur bicistronique portant le SBS entre les deux gènes rapporteurs. La surexpression de Stau1 n'a pas permis dans ces conditions de stimuler la traduction du second gène rapporteur (SDB et LDG, données non publiées), ce qui suggère que Stau1 n'est pas en mesure de faire une stimulation traductionnelle coiffe-indépendante. Par contre, ces essais furent faits avec des rapporteurs bicistroniques, ce qui n'est guère représentatif d'un messenger cible endogène. L'emploi d'autres stratégies telles que l'expression de la protéase L du Foot-and-mouth disease virus (FMDV), qui clive le facteur eIF4G (Devaney et al., 1988), permettrait de tester la capacité de Stau1 à stimuler la traduction coiffe-indépendante d'un messenger dans un contexte sans doute plus représentatif.

Bien que pour l'instant aucun ARNm ne portant un IRES connu n'ait été identifié dans les RNPs contenant Stau1, la possibilité que Stau1 puisse s'associer à de tels messagers n'est pas à exclure. En effet, la vérification de la composition en ARN des RNPs de Stau1 à des moments où la traduction coiffe-indépendante est plus active permettrait de répondre à cette question. On pourrait par exemple synchroniser des cellules dans la phase G2/M et vérifier par immunoprécipitation si Stau1 est associé à des transcrits portant des IRES. En effet, c'est dans cette phase du cycle cellulaire que la traduction coiffe-dépendante est inhibée et où plusieurs messagers avec des IRES sont traduits efficacement (Sachs, 2000). Dans l'éventualité où de tels transcrits seraient identifiés, le potentiel de régulation de la traduction de messagers cellulaires portant des IRES serait à vérifier.

Une avenue intéressante à adopter afin de préciser le mécanisme par lequel Stau1 stimule la traduction de certains messagers serait de disséquer les étapes de l'initiation de la traduction de rapporteurs stimulés par Stau1. Cette stratégie a été employée dans une étude portant sur le répresseur traductionnel Bruno (Chekulaeva et al., 2006). C'est à l'aide de différentes drogues que cette approche est possible. En effet, on peut de cette façon déterminer quelle étape de l'initiation de la traduction est limitante (recrutement du 43S, formation du 48S ou assemblage du complexe 80S) et donc où Stau1 entrerait en jeu.

Il serait également pertinent de vérifier si Stau1 interagit avec des facteurs d'initiation de la traduction. De simples immunoprécipitations permettraient de répondre à

cette question et pourraient donner de précieux indices quant au mécanisme par lequel Stau1 stimule la traduction de certains ARNm cellulaires.

4.1.2. Régulation de la stabilité et de la traduction des ARNs, des fonctions antagonistes ?

Il est légitime de se questionner sur la pertinence pour une protéine de réguler négativement la stabilité des ARNm d'une part et d'en stimuler la traduction d'une autre part. Les résultats présentés dans l'article 1 montrent que la liaison de Stau1 dans la région 5' non-traduite d'un messenger en permet la stimulation traductionnelle. Par contre, le mécanisme du SMD requiert que Stau1 s'associe avec la région 3' non-traduite du messenger et ce, à une distance minimale de 20-25 nucléotides du codon stop (Kim et al., 2005). C'est donc dire qu'une première différence notable entre les deux fonctions est observée. Il est donc proposé que la position du site de liaison à Stau1 dans le transcrit détermine la suite des événements une fois que Stau1 s'y sera lié. En effet, nous n'avons pour l'instant aucune évidence suggérant que lorsque Stau1 se lie dans le 3'UTR d'un messenger, la traduction de celui-ci soit stimulée ou que la liaison de Stau1 dans le 5'UTR d'un ARNm en influence la stabilité.

Il faut d'ailleurs noter que Stau1 n'est pas la seule protéine de liaison à l'ARN à jouer le double rôle de régulation de la stabilité des ARNs et de contrôle de la traduction. Upf1, facteur du NMD et partenaire protéique de Stau1, provoque la dégradation d'un ARN messenger lorsque lié dans son 3'UTR. Par contre, lorsqu'Upf1 est lié directement à la

région codante d'un ARN, la traduction de ce dernier s'en trouve stimulée (Nott et al., 2004). Il en va de même pour la majorité des facteurs impliqués dans le NMD. La protéine HuR est également impliquée dans la régulation de la stabilité des ARNs ainsi que dans le contrôle traductionnel de certains messagers. En effet, HuR lie les éléments AU riches (AREs) présents dans certains messagers afin de stabiliser ceux-ci (Brennan and Steitz, 2001). De plus, HuR stimule la traduction de certains ARNm tels p53, cytochrome *c* et prothymosin α (Kawai et al., 2006; Lal et al., 2005; Mazan-Mamczarz et al., 2003) tout en réprimant celle de p27, Wnt-5a et IGF-IR (Kullmann et al., 2002; Leandersson et al., 2006; Meng et al., 2005).

C'est donc dire que les fonctions de Stau1 dans la régulation de la stabilité et de la traduction des ARNs ne sont pas en opposition, mais bien complémentaires. En effet, des populations distinctes d'ARN peuvent être régulées différemment par Stau1 selon la position du SBS dans le messager.

La question de la coordination des fonctions de localisation, de contrôle traductionnel et de contrôle de la stabilité des ARNm par Stau1 demeure à ce jour sans réponse. Toutefois, des données obtenues dans le laboratoire du Dr DesGroseillers, et n'ayant pas encore fait l'objet de publication, permettent de penser que des modifications post-traductionnelles de Stau1 pourraient être impliquées dans cette régulation. En effet, des expériences ont permis de montrer que Stau1 peut être phosphorylé, sumoylé et arginine-méthylé. Il est bien connu dans la littérature que de telles modifications post-

traductionnelles peuvent influencer sur l'interaction entre différentes protéines. Par exemple, la phosphorylation de HuR favorise son association avec 14-3-3, ce qui contribue à sa localisation nucléaire (Kim et al., 2008). On pourrait donc imaginer que Stau1 dans son état phosphorylé aurait une grande affinité pour son partenaire de SMD, Upf1, tandis que dans son état hypo-phosphorylé, Stau1 pourrait plutôt être incorporé dans des granules de localisation de l'ARN ou associé à des ribosomes afin de favoriser la traduction de certains messagers. Des modifications post-traductionnelles pourraient également favoriser la séquestration de Stau1 à proximité de compartiments cellulaires spécifiques permettant de faciliter la complétion de l'une ou l'autre de ses fonctions cellulaires.

4.1.3. Modèle traductionnel proposé

Grâce aux données montrées dans l'article 1, nous suggérons un modèle dans lequel Stau1 favorise l'initiation de la traduction de certains messagers (Figure 1). Stau1, s'associe à un ARNm via une structure double-brin formant un SBS dans la région 5' non-traduite. Stau1 permet ensuite la localisation du messenger jusqu'à sa destination. Il est à noter que bien que la majorité des signaux de localisation d'ARNm soient situés dans la région 3'UTR, des études ont montré que des signaux présents dans la région 5'UTR ou codante sont importants pour la localisation de certains messagers (Chartrand et al., 1999; Claussen et al., 2004; Muslimov et al., 2004; Serano and Rubin, 2003; Thio et al., 2000). Un SBS situé

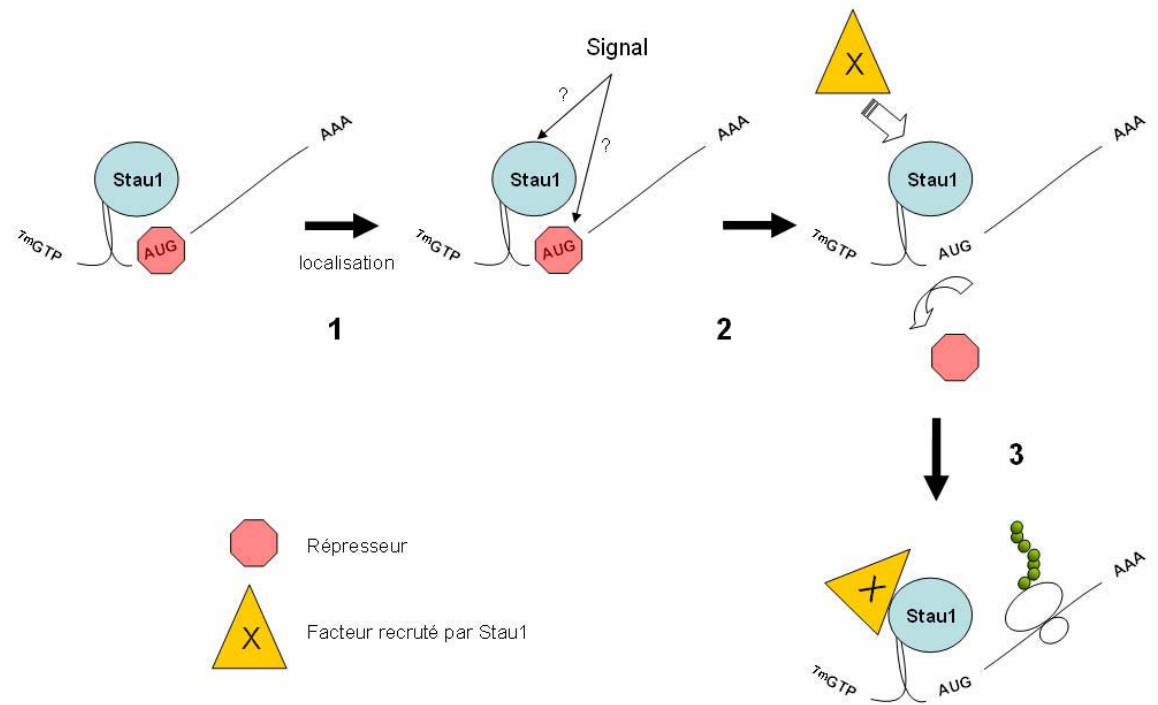


Figure 1 Modèle de stimulation traductionnelle par la protéine Stau1

(1) Stau1 s'associe à un messenger réprimé traductionnellement par une structure d'ARN double-brin ou un facteur de répression. **(2)** Suite à la localisation de l'ARNm, un signal permet de lever la répression traductionnelle en ciblant Stau1 ou un répresseur. **(3)** Stau1 peut ensuite stimuler la traduction du messenger en recrutant un facteur pour l'instant inconnu ou une sous-unité ribosomique.

dans la région 5'UTR pourrait donc jouer un rôle dans la localisation de certains ARNm. Une fois le RNP bien localisé, une signalisation permettra de lever la répression traductionnelle présente lors du transport, permettant ainsi à Stau1 de stimuler la traduction du messager. Le signal permettant cette séquence d'événements pourrait être une modification post-traductionnelle de Stau1 ou d'un facteur de répression de la traduction qui sera écarté. Cette stimulation se fera soit via le recrutement d'un partenaire qui favorisera l'initiation (facteur de traduction ou hélicase par exemple), soit par le recrutement direct d'une sous-unité ribosomique ou par la déstabilisation de la structure double-brin par Stau1 qui pourrait favoriser une conformation alternative de la structure qui serait plus permissive pour l'initiation de la traduction.

4.2. Le lien traductionnel de Stau1 avec des ARNm cellulaires

L'identification de messagers cellulaires voyant leur distribution modifiée dans les polysomes suite à la surexpression de Stau1 (article 2) a permis de confirmer la pertinence biologique des résultats observés avec des gènes rapporteurs dans l'article 1. En effet, l'article 2 a permis de faire un lien entre la présence de certains ARNm dans les RNPs contenant Stau1 et leur stimulation traductionnelle par cette protéine. De plus en appui à nos résultats, une étude récente montre que lorsque Stau1 est sous-exprimé par siRNA, le niveau de protéine *c-myc* est diminuée au niveau cellulaire tandis que les niveaux d'ARN *c-myc* demeurent stables (Weidensdorfer et al., 2008). Il est donc intéressant de noter que

l'activité de dérégulation de la traduction observée chez *dmStaufen* semble avoir été conservée chez l'humain. Toutefois, certains points demeurent à être éclaircis en ce qui concerne le lien unissant Stau1 à ces messagers.

4.2.1. L'interaction avec les messagers

La nature ou la structure exacte du site de liaison à Stau1 présents sur les ARNm liés ne sont pas parfaitement connus présentement. Pour l'instant, le seul SBS caractérisé est celui d'Arf1 et est constitué d'une tige d'ARN double-brin de 19 paires de bases (Kim et al., 2007). Il serait donc profitable de déterminer, dans un premier temps, quelle est la région liée par Stau1 sur les messagers traductionnellement stimulés. Ceci permettrait de vérifier si la stimulation traductionnelle médiée par Stau1 ne peut se faire qu'à partir d'un SBS positionné dans la région 5' non-traduite ou si un SBS présent dans la région codante peut également mener à cette stimulation. De plus, l'identification d'une série de SBS présents dans différents messagers pourrait fournir des données importantes afin de préciser la nature exacte des sites reconnus par Stau1 sur un transcrit.

Il serait également intéressant de vérifier si les SBS identifiés sur ces messagers sont responsables d'une répression traductionnelle de l'ARNm. En effet, les rapporteurs employés comme modèles dans l'article 1 sont des messagers dont la traduction est limitée par une structure d'ARN double brin. Ainsi, Stau1 dérégule la traduction de ces ARNs. On pourrait toutefois envisager que Stau1 soit en mesure de stimuler la traduction d'un ARN n'étant pas traductionnellement réprimé. Afin de vérifier cette hypothèse, on pourrait

employer des cellules déplétées en Stau1 par siRNA et comparer l'efficacité traductionnelle d'un messenger cellulaire portant son SBS intact ou muté.

4.2.2. Le déplacement des ARNs dans le gradient a-t-il vraiment lieu dans les polysomes ?

L'article 2 est basé sur le principe que les messagers identifiés sont enrichis dans les fractions contenant les polysomes lourds de la cellule (cinq ribosomes et plus par molécule d'ARN.). Toutefois, des études récentes ont montré que des structures cellulaires contenant des ARNs pouvaient cofractionner avec les ribosomes dans un gradient de saccharose (Thermann and Hentze, 2007). Une étude a montré que Stau1 était un constituant ubiquiste des granules de stress (Thomas et al., 2005) et donc qu'il pouvait se trouver présent dans de larges structures cytoplasmiques. Dans un même ordre d'idée, chez la drosophile, dans les granules contenant Staufén, on recense des constituants des corps processifs (p-bodies) tels Me31B, Xrn1p et Dcp1p (Barbee et al., 2006; Eulalio et al., 2007). Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a toutefois été publiée en ce qui concerne le lien de Stau1 avec les p-bodies chez les mammifères. L'enrichissement d'ARNs dans les fractions plus denses du gradient de saccharose pourrait être causé par Stau1, non pas au niveau traductionnel, mais plutôt grâce à la formation de structures denses au niveau du cytoplasme telles des granules de stress ou des p-bodies.

Cependant, nous ne privilégions pas cette éventualité, et ce pour deux raisons. Dans un premier temps, le nombre de messagers enrichis dans ce que nous appelons les fractions

de polysomes lourds est relativement limité (35 transcrits différents). Ceci ne cadre donc pas avec ce qui fut observé lorsque Stau1 est incorporé dans les granules de stress. En effet, lorsque Stau1 est recruté dans les granules de stress, un changement global de la distribution des ARN polyadénylés est observé (Thomas et al., 2005). On peut appliquer un raisonnement similaire en ce qui concerne les p-bodies. En effet, la formation des p-bodies est la conséquence et non la cause de la dégradation des ARNm (Eulalio et al., 2007). C'est donc dire que si l'enrichissement d'ARNm dans les fractions plus lourdes d'un gradient de saccharose présenté dans l'article 2 était causé par la formation de p-bodies, on devrait y retrouver des messagers ciblés par le SMD. Or, parmi la liste des 35 ARNm identifiés, aucun ne semble être un substrat du SMD (Kim et al., 2007). La seconde raison qui nous conforte dans l'idée que l'enrichissement observé a bel et bien lieu au niveau des polysomes est que Stau1 est principalement associé à des polysomes actifs en traduction. Tel que présenté à la figure 7 de l'article 1, Stau1, même lorsque surexprimé, voit sa distribution dans un gradient de saccharose changer selon que l'on traite l'extrait cellulaire avec du cycloheximide ou de l'azide de sodium (NaN_3). Ceci confirme donc que Stau1 est associé majoritairement à des polysomes actifs en traduction et non pas à des granules de stress ou à des p-bodies.

4.3. L'auto-association de Stau1 et ses fonctions cellulaires

Les données présentées dans l'article 3 démontrent clairement que Stau1 est en mesure de s'associer directement avec lui-même afin de former des complexes

multimériques. Cependant, plusieurs points restent à élucider afin de bien saisir l'importance de cette auto-association pour l'accomplissement des diverses fonctions cellulaires de Stau1.

4.3.1. Dimères ou multimères ?

Une molécule de Stau1 est en mesure de s'associer à au moins une autre molécule de Stau1. Toutefois, la stoechiométrie de cette interaction demeure inconnue. En effet, l'identité du complexe fonctionnel des molécules Stau1 n'a pas été résolue à ce jour. Chez les protéines liant l'ARN, des structures en homodimères et en multimères ont été identifiées (Niessing et al., 2004; Soller and White, 2005). Différentes avenues sont possibles afin de répondre à cette question. En premier lieu, il est possible de procéder à des essais de BRET à trois partenaires (Gales et al., 2006). De cette façon, on peut évaluer si plus de deux molécules Stau1 interagissent à la fois. D'autres stratégies sont également envisageables, comme l'emploi d'agents pontants, des essais de retard sur gel avec un substrat ARN de Stau1 ou des études de chromatographie d'exclusion de taille avec de la protéine Stau1 recombinante. De façon intéressante, une étude présentant des résultats de gel-filtration sur des extraits de cerveaux de jeunes rats a montré que, dans ce contexte, très peu de molécules de Stau1 sont présentes sous forme de monomères (Mallardo et al., 2003). En effet, Stau1 est observé dans de larges complexes de 2 mDa ou de 670 kDa mais également dans ce qui pourrait s'avérer être des dimères. Cet article présente donc des résultats suggérant que Stau1 n'est pas majoritairement monomérique dans la cellule mais

ne donne toutefois pas d'information en ce qui concerne l'importance relative des complexes multimériques et dimériques.

4.3.2. Régulation par l'auto-association

L'auto-association peut potentiellement influencer une panoplie de phénomènes cellulaires auxquels Stau1 est associé. Effectivement, l'auto-association pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance des substrats d'ARN de Stau1. Par exemple, une structure en dimère ou en multimère pourrait conférer à Stau1 une certaine sélectivité pour la reconnaissance de structures précises d'ARNs double-brin. Dans cette éventualité, l'auto-association de Stau1 serait d'une importance majeure pour les fonctions de localisation de l'ARN, de régulation post-transcriptionnelle de l'ARN et de traduction menées par Stau1 car ces activités sont toutes dépendantes de la liaison à l'ARN de Stau1.

L'auto-association de Stau1 pourrait également être importante pour l'association de Stau1 avec ses partenaires protéiques et donc pour l'assemblage des granules et des particules dans les neurones par exemple. Ceci pourrait influencer les fonctions cellulaires de Stau1 au niveau du système nerveux et donc la morphologie des neurones (Lebeau et al., 2008b).

Toutefois, afin d'évaluer l'importance de l'auto-association pour les fonctions cellulaires de Stau1, il faudra être en mesure d'identifier un mutant de Stau1 n'étant plus en mesure de dimériser/multimériser et dont la capacité à lier l'ARN serait intacte. Jusqu'à présent, malgré plusieurs essais, un tel mutant n'a pu être généré. Une façon intéressante

d'obtenir de l'information supplémentaire afin d'identifier un tel mutant serait de procéder à des études de la structure de Stau1 avec une protéine complète. En effet, jusqu'à maintenant, toutes les études de structures concernant Staufen ont été effectuées avec le dsRBD3 uniquement (Bycroft et al., 1995; Ramos et al., 2000). Dans la mesure où des dimères/multimères seraient observés, une telle étude permettrait de confirmer les résultats présentés dans l'article 3 concernant les domaines importants pour l'auto-association. De plus, grâce à l'identification des région(s) de contact(s) entre deux molécules, il serait plus aisé de cibler des acides aminés précis à muter afin d'obtenir un mutant liant l'ARN mais n'étant plus en mesure de procéder à une auto-association. Par contre, dans l'éventualité où une auto-association ne serait pas observée, de nouvelles données concernant le repliement de Stau1 seraient obtenues. Ces résultats seraient précieux puisqu'on pourrait alors connaître les domaines exposés et accessibles pour interagir avec des partenaires protéiques ou des substrats d'ARN.

5. Conclusions

Le transport et la traduction localisée des ARNm sont impliqués dans une large panoplie de phénomènes cellulaires, que ce soit chez la levure, chez la drosophile ou chez les mammifères. Les protéines liant l'ARN sont le pivot central de ces divers mécanismes puisqu'elles accompagnent les messagers depuis leur transcription dans le noyau jusqu'à leur destination finale. Stau1 fait partie de cette famille de protéines et les données présentées dans cette thèse ont permis, dans un premier temps, de lui attribuer une nouvelle fonction chez les mammifères. En effet, nous avons montré que Stau1 peut stimuler la traduction d'un ARNm lorsqu'il est lié dans la région 5' non-traduite de celui-ci. De plus, Stau1 est en mesure de promouvoir la traduction d'une population d'ARNm cellulaires qui sont retrouvés dans les RNPs contenant Stau1. Dans un second temps, nous avons montré la capacité d'auto-association de Stau1 qui pourrait s'avérer être un mécanisme de régulation des activités cellulaires de Stau1.

Dans l'ensemble, ces résultats nous permettent de mieux comprendre le fonctionnement cellulaire de Stau1 et nous fournissent de précieuses informations en ce qui concerne les mécanismes de localisation et de traduction localisée de l'ARN qui sont d'une importance cruciale pour l'établissement de la mémoire. De plus, ces données seront en mesure de nous éclairer et de suggérer des réponses possibles lorsque des phénotypes associés à l'absence de Stau1 seront identifiés chez un organisme mammifère.

6. Bibliographie

- Abraham, W.C., and Williams, J.M. (2008). LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. *Neurobiol Learn Mem* 89, 260-268.
- Algire, M.A., and Lorsch, J.R. (2006). Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Curr Opin Chem Biol* 10, 480-486.
- Arava, Y. (2003). Isolation of polysomal RNA for microarray analysis. *Methods Mol Biol* 224, 79-87.
- Arava, Y., Wang, Y., Storey, J.D., Liu, C.L., Brown, P.O., and Herschlag, D. (2003). Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3889-3894.
- Audic, Y., and Hartley, R.S. (2004). Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol Cell* 96, 479-498.
- Banko, J.L., and Klann, E. (2008). Cap-dependent translation initiation and memory. *Prog Brain Res* 169, 59-80.
- Barbee, S.A., Estes, P.S., Cziko, A.M., Hillebrand, J., Luedeman, R.A., Collier, J.M., Johnson, N., Howlett, I.C., Geng, C., Ueda, R., *et al.* (2006). Staufe- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* 52, 997-1009.
- Belanger, G., Stocksley, M.A., Vandromme, M., Schaeffer, L., Furic, L., DesGroseillers, L., and Jasmin, B.J. (2003). Localization of the RNA-binding proteins Staufe1 and Staufe2 at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurochem* 86, 669-677.
- Blichenberg, A., Schwanke, B., Rehbein, M., Garner, C.C., Richter, D., and Kindler, S. (1999). Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J Neurosci* 19, 8818-8829.
- Bobola, N., Jansen, R.P., Shin, T.H., and Nasmyth, K. (1996). Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* 84, 699-709.
- Bohl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., and Jansen, R.P. (2000). She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *EMBO J* 19, 5514-5524.
- Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H.J., Buck, F., Richter, D., and Kindler, S. (2004). Characterization of Staufe 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* 384, 239-246.

- Brendza, R.P., Serbus, L.R., Duffy, J.B., and Saxton, W.M. (2000). A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Staufen protein. *Science* 289, 2120-2122.
- Brennan, C.M., and Steitz, J.A. (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58, 266-277.
- Broadus, J., Fuerstenberg, S., and Doe, C.Q. (1998). Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391, 792-795.
- Buchner, G., Bassi, M.T., Andolfi, G., Ballabio, A., and Franco, B. (1999). Identification of a novel homolog of the *Drosophila* staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* 62, 113-118.
- Bycroft, M., Grunert, S., Murzin, A.G., Proctor, M., and St Johnston, D. (1995). NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *EMBO J* 14, 3563-3571.
- Castagnetti, S., and Ephrussi, A. (2003). Orb and a long poly(A) tail are required for efficient oskar translation at the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development* 130, 835-843.
- Cenci, C., Barzotti, R., Galeano, F., Corbelli, S., Rota, R., Massimi, L., Di Rocco, C., O'Connell, M.A., and Gallo, A. (2008). Down-regulation of RNA editing in pediatric astrocytomas: ADAR2 editing activity inhibits cell migration and proliferation. *J Biol Chem* 283, 7251-7260.
- Chamieh, H., Ballut, L., Bonneau, F., and Le Hir, H. (2008). NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat Struct Mol Biol* 15, 85-93.
- Chang, J.S., Tan, L., and Schedl, P. (1999). The *Drosophila* CPEB homolog, orb, is required for oskar protein expression in oocytes. *Dev Biol* 215, 91-106.
- Chartrand, P., Meng, X.H., Singer, R.H., and Long, R.M. (1999). Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr Biol* 9, 333-336.
- Chatel-Chaix, L., Abrahamyan, L., Frechina, C., Mouland, A.J., and DesGroseillers, L. (2007). The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *J Virol* 81, 6216-6230.
- Chatel-Chaix, L., Boulay, K., Mouland, A.J., and Desgroseillers, L. (2008). The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology* 5, 41.

- Chatel-Chaix, L., Clement, J.F., Martel, C., Beriault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L., and Mouland, A.J. (2004). Identification of Staufén in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol* 24, 2637-2648.
- Chekulaeva, M., Hentze, M.W., and Ephrussi, A. (2006). Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles. *Cell* 124, 521-533.
- Clark, A., Meignin, C., and Davis, I. (2007). A Dynein-dependent shortcut rapidly delivers axis determination transcripts into the *Drosophila* oocyte. *Development* 134, 1955-1965.
- Clark, I., Giniger, E., Ruohola-Baker, H., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1994). Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the *Drosophila* oocyte. *Curr Biol* 4, 289-300.
- Claussen, M., Horvay, K., and Pieler, T. (2004). Evidence for overlapping, but not identical, protein machineries operating in vegetal RNA localization along early and late pathways in *Xenopus* oocytes. *Development* 131, 4263-4273.
- Clemens, M.J. (1997). PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 945-949.
- Cooke, S.F., and Bliss, T.V. (2006). Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129, 1659-1673.
- Corral-Debrinski, M. (2007). mRNA specific subcellular localization represents a crucial step for fine-tuning of gene expression in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1773, 473-475.
- Cosma, M.P. (2004). Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander. *EMBO Rep* 5, 953-957.
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561-563.
- Crick, F.H. (1958). On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* 12, 138-163.
- Czaplinski, K., Weng, Y., Hagan, K.W., and Peltz, S.W. (1995). Purification and characterization of the Upf1 protein: a factor involved in translation and mRNA degradation. *RNA* 1, 610-623.
- Daher, A., Longuet, M., Dorin, D., Bois, F., Segéral, E., Bannwarth, S., Battisti, P.L., Purcell, D.F., Benarous, R., Vaquero, C., *et al.* (2001). Two dimerization domains in the trans-activation response RNA-binding protein (TRBP) individually reverse the protein kinase R inhibition of HIV-1 long terminal repeat expression. *J Biol Chem* 276, 33899-33905.

- Dar, A.C., Dever, T.E., and Sicheri, F. (2005). Higher-order substrate recognition of eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* 122, 887-900.
- Darlix, J.L., Gabus, C., Nugeyre, M.T., Clavel, F., and Barre-Sinoussi, F. (1990). Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J Mol Biol* 216, 689-699.
- Darzacq, X., Powrie, E., Gu, W., Singer, R.H., and Zenklusen, D. (2003). RNA asymmetric distribution and daughter/mother differentiation in yeast. *Curr Opin Microbiol* 6, 614-620.
- Davis, L., Banker, G.A., and Steward, O. (1987). Selective dendritic transport of RNA in hippocampal neurons in culture. *Nature* 330, 477-479.
- Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C., and Lempicki, R.A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4, P3.
- DesGroseillers, L., and Lemieux, N. (1996). Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 36, 527-529.
- Devaney, M.A., Vakharia, V.N., Lloyd, R.E., Ehrenfeld, E., and Grubman, M.J. (1988). Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J Virol* 62, 4407-4409.
- Dever, T.E. (2002). Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108, 545-556.
- Dey, M., Cao, C., Dar, A.C., Tamura, T., Ozato, K., Sicheri, F., and Dever, T.E. (2005). Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell* 122, 901-913.
- Dollar, G., Struckhoff, E., Michaud, J., and Cohen, R.S. (2002). Rab11 polarization of the *Drosophila* oocyte: a novel link between membrane trafficking, microtubule organization, and oskar mRNA localization and translation. *Development* 129, 517-526.
- Doyle, M., and Jantsch, M.F. (2002). New and old roles of the double-stranded RNA-binding domain. *J Struct Biol* 140, 147-153.
- Doyle, M., and Jantsch, M.F. (2003). Distinct in vivo roles for double-stranded RNA-binding domains of the *Xenopus* RNA-editing enzyme ADAR1 in chromosomal targeting. *J Cell Biol* 161, 309-319.
- Du, T.G., Schmid, M., and Jansen, R.P. (2007). Why cells move messages: the biological functions of mRNA localization. *Semin Cell Dev Biol* 18, 171-177.

- Dubnau, J., Chiang, A.S., Grady, L., Barditch, J., Gossweiler, S., McNeil, J., Smith, P., Buldoc, F., Scott, R., Certa, U., *et al.* (2003). The staufer/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol* 13, 286-296.
- Duchaine, T., Wang, H.J., Luo, M., Steinberg, S.V., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. (2000). A novel murine Staufer isoform modulates the RNA content of Staufer complexes. *Mol Cell Biol* 20, 5592-5601.
- Duchaine, T.F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M.A., and DesGroseillers, L. (2002). Staufer2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* 115, 3285-3295.
- Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A.J., and DesGroseillers, L. (2005). Interaction of Staufer1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33, 4797-4812.
- Erdelyi, M., Michon, A.M., Guichet, A., Glotzer, J.B., and Ephrussi, A. (1995). Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization. *Nature* 377, 524-527.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E. (2007). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 27, 3970-3981.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C., and St Johnston, D. (1994). Staufer protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79, 1221-1232.
- Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E., and Nusslein-Volhard, C. (1997). RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFER ribonucleoprotein particles. *EMBO J* 16, 1751-1758.
- Frey, U., and Morris, R.G. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385, 533-536.
- Fuerstenberg, S., Peng, C.Y., Alvarez-Ortiz, P., Hor, T., and Doe, C.Q. (1998). Identification of Miranda protein domains regulating asymmetric cortical localization, cargo binding, and cortical release. *Mol Cell Neurosci* 12, 325-339.
- Furic, L., Maher-Laporte, M., and DesGroseillers, L. (2008). A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufer1- and Staufer2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA* 14, 324-335.
- Gales, C., Van Durm, J.J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., and Bouvier, M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13, 778-786.

- Gallie, D.R., Lewis, N.J., and Marzluff, W.F. (1996). The histone 3'-terminal stem-loop is necessary for translation in Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Res* 24, 1954-1962.
- Gallo, A., Keegan, L.P., Ring, G.M., and O'Connell, M.A. (2003). An ADAR that edits transcripts encoding ion channel subunits functions as a dimer. *EMBO J* 22, 3421-3430.
- Garcia, M.A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., and Esteban, M. (2006). Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 1032-1060.
- Garcia, M.A., Meurs, E.F., and Esteban, M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* 89, 799-811.
- Gerber, A.P., Herschlag, D., and Brown, P.O. (2004). Extensive association of functionally and cytotopically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol* 2, E79.
- Glotzer, J.B., Saffrich, R., Glotzer, M., and Ephrussi, A. (1997). Cytoplasmic flows localize injected oskar RNA in *Drosophila* oocytes. *Curr Biol* 7, 326-337.
- Gonzalez, I., Buonomo, S.B., Nasmyth, K., and von Ahsen, U. (1999). ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Curr Biol* 9, 337-340.
- Gorgoni, B., Andrews, S., Schaller, A., Schumperli, D., Gray, N.K., and Muller, B. (2005). The stem-loop binding protein stimulates histone translation at an early step in the initiation pathway. *RNA* 11, 1030-1042.
- Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D., and Singer, R.H. (2004). A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev* 18, 1452-1465.
- Haarer, B.K., Petzold, A., Lillie, S.H., and Brown, S.S. (1994). Identification of MYO4, a second class V myosin gene in yeast. *J Cell Sci* 107 (Pt 4), 1055-1064.
- Hachet, O., and Ephrussi, A. (2001). *Drosophila* Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport. *Curr Biol* 11, 1666-1674.
- Hachet, O., and Ephrussi, A. (2004). Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* 428, 959-963.
- Haile, D.J., Rouault, T.A., Harford, J.B., Kennedy, M.C., Blondin, G.A., Beinert, H., and Klausner, R.D. (1992). Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11735-11739.

- Hieronimus, H., and Silver, P.A. (2004). A systems view of mRNP biology. *Genes Dev* 18, 2845-2860.
- Higuchi, M., Maas, S., Single, F.N., Hartner, J., Rozov, A., Burnashev, N., Feldmeyer, D., Sprengel, R., and Seeburg, P.H. (2000). Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* 406, 78-81.
- Hitti, E.G., Sallacz, N.B., Schoft, V.K., and Jantsch, M.F. (2004). Oligomerization activity of a double-stranded RNA-binding domain. *FEBS Lett* 574, 25-30.
- Hoyle, N.P., and Ashe, M.P. (2008). Subcellular localization of mRNA and factors involved in translation initiation. *Biochem Soc Trans* 36, 648-652.
- Huynh, J.R., Munro, T.P., Smith-Litiere, K., Lepesant, J.A., and St Johnston, D. (2004). The *Drosophila* hnRNPA/B homolog, Hrp48, is specifically required for a distinct step in *osk* mRNA localization. *Dev Cell* 6, 625-635.
- Jaeger, S., Barends, S., Giege, R., Eriani, G., and Martin, F. (2005). Expression of metazoan replication-dependent histone genes. *Biochimie* 87, 827-834.
- Jansen, R.P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M., and Nasmyth, K. (1996). Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* 84, 687-697.
- Job, C., and Eberwine, J. (2001). Identification of sites for exponential translation in living dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13037-13042.
- Johnstone, O., and Lasko, P. (2001). Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu Rev Genet* 35, 365-406.
- Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43, 513-525.
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038.
- Kapp, L.D., and Lorsch, J.R. (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* 73, 657-704.
- Kash, J.C., Cunningham, D.M., Smit, M.W., Park, Y., Fritz, D., Wilusz, J., and Katze, M.G. (2002). Selective translation of eukaryotic mRNAs: functional molecular analysis of GRSF-1, a positive regulator of influenza virus protein synthesis. *J Virol* 76, 10417-10426.
- Kawai, T., Lal, A., Yang, X., Galban, S., Mazan-Mamczarz, K., and Gorospe, M. (2006). Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol Cell Biol* 26, 3295-3307.

- Keene, J.D. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8, 533-543.
- Keene, J.D., and Tenenbaum, S.A. (2002). Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell* 9, 1161-1167.
- Kelleher, R.J., 3rd, Govindarajan, A., Jung, H.Y., Kang, H., and Tonegawa, S. (2004a). Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116, 467-479.
- Kelleher, R.J., 3rd, Govindarajan, A., and Tonegawa, S. (2004b). Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44, 59-73.
- Kharrat, A., Macias, M.J., Gibson, T.J., Nilges, M., and Pastore, A. (1995). Structure of the dsRNA binding domain of E. coli RNase III. *EMBO J* 14, 3572-3584.
- Kiebler, M.A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R.M., Ortin, J., and Dotti, C.G. (1999). The mammalian stau protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* 19, 288-297.
- Kim-Ha, J., Kerr, K., and Macdonald, P.M. (1995). Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* 81, 403-412.
- Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Lal, A., Pullmann, R., Jr., Yang, X., Galban, S., Srikantan, S., Martindale, J.L., Blethrow, J., Shokat, K.M., *et al.* (2008). Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1. *Genes Dev* 22, 1804-1815.
- Kim, Y.K., Furic, L., Desgroseillers, L., and Maquat, L.E. (2005). Mammalian Stau1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120, 195-208.
- Kim, Y.K., Furic, L., Parisien, M., Major, F., DesGroseillers, L., and Maquat, L.E. (2007). Stau1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *EMBO J* 26, 2670-2681.
- Kloc, M., Zearfoss, N.R., and Etkin, L.D. (2002). Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* 108, 533-544.
- Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P., and Silver, P.A. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* 131, 557-571.
- Koushika, S.P., Soller, M., and White, K. (2000). The neuron-enriched splicing pattern of *Drosophila* erect wing is dependent on the presence of ELAV protein. *Mol Cell Biol* 20, 1836-1845.

- Kozak, M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J* 16, 2482-2492.
- Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299, 1-34.
- Kozak, M. (2004). How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mRNAs? *Gene* 343, 41-54.
- Kozak, M. (2005). Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 361, 13-37.
- Krichevsky, A.M., and Kosik, K.S. (2001). Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* 32, 683-696.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E., and Cech, T.R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31, 147-157.
- Kuhn, K.M., DeRisi, J.L., Brown, P.O., and Sarnow, P. (2001). Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. *Mol Cell Biol* 21, 916-927.
- Kullmann, M., Gopfert, U., Siewe, B., and Hengst, L. (2002). ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev* 16, 3087-3099.
- Lal, A., Kawai, T., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K., and Gorospe, M. (2005). Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin alpha. *EMBO J* 24, 1852-1862.
- Lamontagne, B., Tremblay, A., and Abou Elela, S. (2000). The N-terminal domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage. *Mol Cell Biol* 20, 1104-1115.
- Lane, M.E., and Kalderon, D. (1994). RNA localization along the anteroposterior axis of the *Drosophila* oocyte requires PKA-mediated signal transduction to direct normal microtubule organization. *Genes Dev* 8, 2986-2995.
- Langland, J.O., Cameron, J.M., Heck, M.C., Jancovich, J.K., and Jacobs, B.L. (2006). Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses. *Virus Res* 119, 100-110.
- Lantz, V.A., Clemens, S.E., and Miller, K.G. (1999). The actin cytoskeleton is required for maintenance of posterior pole plasm components in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* 85, 111-122.

- Le Hir, H., Gatfield, D., Braun, I.C., Forler, D., and Izaurralde, E. (2001). The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO Rep* 2, 1119-1124.
- Leandersson, K., Riesbeck, K., and Andersson, T. (2006). Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-like protein HuR in human breast epithelial cells. *Nucleic Acids Res* 34, 3988-3999.
- Lebeau, G., Maher-Laporte, M., Topolnik, L., Laurent, C.E., Sossin, W., Desgroseillers, L., and Lacaille, J.C. (2008a). Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol*.
- Lebeau, G., Maher-Laporte, M., Topolnik, L., Laurent, C.E., Sossin, W., Desgroseillers, L., and Lacaille, J.C. (2008b). Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol* 28, 2896-2907.
- Lee, T.G., Tang, N., Thompson, S., Miller, J., and Katze, M.G. (1994). The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins. *Mol Cell Biol* 14, 2331-2342.
- Leipuviene, R., and Theil, E.C. (2007). The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron and oxygen. *Cell Mol Life Sci* 64, 2945-2955.
- Lemaire, P.A., Lary, J., and Cole, J.L. (2005). Mechanism of PKR activation: dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA. *J Mol Biol* 345, 81-90.
- Levanon, E.Y., Eisenberg, E., Yelin, R., Nemzer, S., Hallegger, M., Shemesh, R., Fligelman, Z.Y., Shoshan, A., Pollock, S.R., Sztybel, D., *et al.* (2004). Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome. *Nat Biotechnol* 22, 1001-1005.
- Ling, J., Morley, S.J., Pain, V.M., Marzluff, W.F., and Gallie, D.R. (2002). The histone 3'-terminal stem-loop-binding protein enhances translation through a functional and physical interaction with eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) and eIF3. *Mol Cell Biol* 22, 7853-7867.
- Lisbin, M.J., Qiu, J., and White, K. (2001). The neuron-specific RNA-binding protein ELAV regulates neuroglial alternative splicing in neurons and binds directly to its pre-mRNA. *Genes Dev* 15, 2546-2561.
- Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H., and Chartrand, P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *EMBO J* 19, 6592-6601.

- Lunde, B.M., Moore, C., and Varani, G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 479-490.
- Luo, M., Duchaine, T.F., and DesGroseillers, L. (2002). Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem J* 365, 817-824.
- Lynch, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84, 87-136.
- Macchi, P., Kroening, S., Palacios, I.M., Baldassa, S., Grunewald, B., Ambrosino, C., Goetze, B., Lupas, A., St Johnston, D., and Kiebler, M. (2003). Barentsz, a new component of the Staufen-containing ribonucleoprotein particles in mammalian cells, interacts with Staufen in an RNA-dependent manner. *J Neurosci* 23, 5778-5788.
- Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C., and Kiebler, M.A. (2003). Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2100-2105.
- Manche, L., Green, S.R., Schmedt, C., and Mathews, M.B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* 12, 5238-5248.
- Mansfield, J.H., Wilhelm, J.E., and Hazelrigg, T. (2002). Ypsilon Schachtel, a Drosophila Y-box protein, acts antagonistically to Orb in the oskar mRNA localization and translation pathway. *Development* 129, 197-209.
- Marianayagam, N.J., Sunde, M., and Matthews, J.M. (2004). The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci* 29, 618-625.
- Marion, R.M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C., and Ortin, J. (1999). A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19, 2212-2219.
- Marshall, R.A., Aitken, C.E., Dorywalska, M., and Puglisi, J.D. (2008). Translation at the single-molecule level. *Annu Rev Biochem* 77, 177-203.
- Martel, C., Macchi, P., Furic, L., Kiebler, M.A., and Desgroseillers, L. (2006). Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem J* 393, 245-254.
- Matsuzaki, F., Ohshiro, T., Ikeshima-Kataoka, H., and Izumi, H. (1998). miranda localizes staufen and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early Drosophila embryogenesis. *Development* 125, 4089-4098.
- Matynia, A., Kushner, S.A., and Silva, A.J. (2002). Genetic approaches to molecular and cellular cognition: a focus on LTP and learning and memory. *Annu Rev Genet* 36, 687-720.

Mazan-Mamczarz, K., Galban, S., Lopez de Silanes, I., Martindale, J.L., Atasoy, U., Keene, J.D., and Gorospe, M. (2003). RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8354-8359.

Meignin, C., and Davis, I. (2008). UAP56 RNA helicase is required for axis specification and cytoplasmic mRNA localization in *Drosophila*. *Dev Biol* 315, 89-98.

Meng, Z., King, P.H., Nabors, L.B., Jackson, N.L., Chen, C.Y., Emanuel, P.D., and Blume, S.W. (2005). The ELAV RNA-stability factor HuR binds the 5'-untranslated region of the human IGF-IR transcript and differentially represses cap-dependent and IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res* 33, 2962-2979.

Micklem, D.R., Adams, J., Grunert, S., and St Johnston, D. (2000). Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J* 19, 1366-1377.

Miller, S., Yasuda, M., Coats, J.K., Jones, Y., Martone, M.E., and Mayford, M. (2002). Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 36, 507-519.

Monshausen, M., Putz, U., Rehbein, M., Schweizer, M., DesGroseillers, L., Kuhl, D., Richter, D., and Kindler, S. (2001). Two rat brain staufer isoforms differentially bind RNA. *J Neurochem* 76, 155-165.

Monshausen, M., Rehbein, M., Richter, D., and Kindler, S. (2002). The RNA-binding protein Staufer from rat brain interacts with protein phosphatase-1. *J Neurochem* 81, 557-564.

Mori, Y., Imaizumi, K., Katayama, T., Yoneda, T., and Tohyama, M. (2000). Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat Neurosci* 3, 1079-1084.

Muckenthaler, M., Gray, N.K., and Hentze, M.W. (1998). IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell* 2, 383-388.

Muller, M., Heuck, A., and Niessing, D. (2007). Directional mRNA transport in eukaryotes: lessons from yeast. *Cell Mol Life Sci* 64, 171-180.

Muslimov, I.A., Nimmrich, V., Hernandez, A.I., Tcherepanov, A., Sacktor, T.C., and Tiedge, H. (2004). Dendritic transport and localization of protein kinase Mzeta mRNA: implications for molecular memory consolidation. *J Biol Chem* 279, 52613-52622.

Muslimov, I.A., Titmus, M., Koenig, E., and Tiedge, H. (2002). Transport of Neuronal BC1 RNA in Mauthner Axons. *J Neurosci* 22, 4293-4301.

- Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. (2004). *Drosophila* cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis. *Dev Cell* 6, 69-78.
- Nanduri, S., Rahman, F., Williams, B.R., and Qin, J. (2000). A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *EMBO J* 19, 5567-5574.
- Nelson, M.R., Leidal, A.M., and Smibert, C.A. (2004). *Drosophila* Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *EMBO J* 23, 150-159.
- Newmark, P.A., and Boswell, R.E. (1994). The mago nashi locus encodes an essential product required for germ plasm assembly in *Drosophila*. *Development* 120, 1303-1313.
- Niessing, D., Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Singer, R.H., and Burley, S.K. (2004). She2p is a novel RNA binding protein with a basic helical hairpin motif. *Cell* 119, 491-502.
- Nott, A., Le Hir, H., and Moore, M.J. (2004). Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev* 18, 210-222.
- Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., Sato, T.A., and Anzai, K. (2002). Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J Biol Chem* 277, 37804-37810.
- Ohman, M. (2007). A-to-I editing challenger or ally to the microRNA process. *Biochimie* 89, 1171-1176.
- Palacios, I.M., Gatfield, D., St Johnston, D., and Izaurralde, E. (2004). An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 427, 753-757.
- Pantopoulos, K. (2004). Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1012, 1-13.
- Paquin, N., and Chartrand, P. (2008). Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends Cell Biol* 18, 105-111.
- Paquin, N., Menade, M., Poirier, G., Donato, D., Drouet, E., and Chartrand, P. (2007). Local activation of yeast ASH1 mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p. *Mol Cell* 26, 795-809.
- Pascale, A., Amadio, M., and Quattrone, A. (2008). Defining a neuron: neuronal ELAV proteins. *Cell Mol Life Sci* 65, 128-140.

- Peters, G.A., Hartmann, R., Qin, J., and Sen, G.C. (2001). Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. *Mol Cell Biol* 21, 1908-1920.
- Petry, S., Weixlbaumer, A., and Ramakrishnan, V. (2008). The termination of translation. *Curr Opin Struct Biol* 18, 70-77.
- Poulsen, H., Jorgensen, R., Heding, A., Nielsen, F.C., Bonven, B., and Egebjerg, J. (2006). Dimerization of ADAR2 is mediated by the double-stranded RNA binding domain. *RNA* 12, 1350-1360.
- Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D.R., Proctor, M.R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D., and Varani, G. (2000). RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *EMBO J* 19, 997-1009.
- Roth, S., Neuman-Silberberg, F.S., Barcelo, G., and Schupbach, T. (1995). cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* 81, 967-978.
- Rouault, T.A. (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol* 2, 406-414.
- Ryter, J.M., and Schultz, S.C. (1998). Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J* 17, 7505-7513.
- Sachs, A.B. (2000). Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail. *Cell* 101, 243-245.
- Sanchez-Carbente Mdel, R., and Desgroseillers, L. (2008). Understanding the importance of mRNA transport in memory. *Prog Brain Res* 169, 41-58.
- Sanchez, R., and Marzluff, W.F. (2002). The stem-loop binding protein is required for efficient translation of histone mRNA in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 22, 7093-7104.
- Saunders, L.R., and Barber, G.N. (2003). The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *FASEB J* 17, 961-983.
- Schratt, G.M., Nigh, E.A., Chen, W.G., Hu, L., and Greenberg, M.E. (2004). BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci* 24, 7366-7377.
- Schupbach, T., and Wieschaus, E. (1986). Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Dev Biol* 113, 443-448.

- Serano, J., and Rubin, G.M. (2003). The *Drosophila* synaptotagmin-like protein bitesize is required for growth and has mRNA localization sequences within its open reading frame. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13368-13373.
- Shulman, J.M., Benton, R., and St Johnston, D. (2000). The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* *101*, 377-388.
- Soller, M., and White, K. (2005). ELAV multimerizes on conserved AU4-6 motifs important for ewg splicing regulation. *Mol Cell Biol* *25*, 7580-7591.
- Sonenberg, N., and Dever, T.E. (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* *13*, 56-63.
- St Johnston, D. (2001). The beginning of the end. *EMBO J* *20*, 6169-6179.
- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 363-375.
- St Johnston, D., Beuchle, D., and Nusslein-Volhard, C. (1991). Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* *66*, 51-63.
- St Johnston, D., Brown, N.H., Gall, J.G., and Jantsch, M. (1992). A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 10979-10983.
- Stalder, L., and Muhlemann, O. (2008). The meaning of nonsense. *Trends Cell Biol* *18*, 315-321.
- Steinhauer, J., and Kalderon, D. (2005). The RNA-binding protein Squid is required for the establishment of anteroposterior polarity in the *Drosophila* oocyte. *Development* *132*, 5515-5525.
- Steward, O., and Levy, W.B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci* *2*, 284-291.
- Sunnerhagen, P. (2007). Cytoplasmatic post-transcriptional regulation and intracellular signalling. *Mol Genet Genomics* *277*, 341-355.
- Takizawa, P.A., and Vale, R.D. (2000). The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 5273-5278.
- Taylor, S.S., Haste, N.M., and Ghosh, G. (2005). PKR and eIF2alpha: integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell* *122*, 823-825.

Tenenbaum, S.A., Carson, C.C., Lager, P.J., and Keene, J.D. (2000). Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14085-14090.

Tetzlaff, M.T., Jackle, H., and Pankratz, M.J. (1996). Lack of *Drosophila* cytoskeletal tropomyosin affects head morphogenesis and the accumulation of oskar mRNA required for germ cell formation. *EMBO J* 15, 1247-1254.

Thermann, R., and Hentze, M.W. (2007). *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* 447, 875-878.

Thio, G.L., Ray, R.P., Barcelo, G., and Schupbach, T. (2000). Localization of gurken RNA in *Drosophila* oogenesis requires elements in the 5' and 3' regions of the transcript. *Dev Biol* 221, 435-446.

Thomas, M.G., Martinez Tosar, L.J., Loschi, M., Pasquini, J.M., Correale, J., Kindler, S., and Boccaccio, G.L. (2005). Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell* 16, 405-420.

Toba, G., and White, K. (2008). The third RNA recognition motif of *Drosophila* ELAV protein has a role in multimerization. *Nucleic Acids Res* 36, 1390-1399.

Valente, L., and Nishikura, K. (2007). RNA binding-independent dimerization of adenosine deaminases acting on RNA and dominant negative effects of nonfunctional subunits on dimer functions. *J Biol Chem* 282, 16054-16061.

van Eeden, F.J., Palacios, I.M., Petronczki, M., Weston, M.J., and St Johnston, D. (2001). Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole. *J Cell Biol* 154, 511-523.

Vega Laso, M.R., Zhu, D., Sagliocco, F., Brown, A.J., Tuite, M.F., and McCarthy, J.E. (1993). Inhibition of translational initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a function of the stability and position of hairpin structures in the mRNA leader. *J Biol Chem* 268, 6453-6462.

Villace, P., Marion, R.M., and Ortin, J. (2004). The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 32, 2411-2420.

Wang, Q., Khillan, J., Gadue, P., and Nishikura, K. (2000). Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. *Science* 290, 1765-1768.

Weidensdorfer, D., Stohr, N., Baude, A., Lederer, M., Kohn, M., Schierhorn, A., Buchmeier, S., Wahle, E., and Huttelmaier, S. (2008). Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *RNA*.

Whitfield, M.L., Kaygun, H., Erkmann, J.A., Townley-Tilson, W.H., Dominski, Z., and Marzluff, W.F. (2004). SLBP is associated with histone mRNA on polyribosomes as a component of the histone mRNP. *Nucleic Acids Res* 32, 4833-4842.

Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. (1999). Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19, 2220-2230.

Wilhelm, J.E., Hilton, M., Amos, Q., and Henzel, W.J. (2003). Cup is an eIF4E binding protein required for both the translational repression of oskar and the recruitment of Barentsz. *J Cell Biol* 163, 1197-1204.

Yano, T., Lopez de Quinto, S., Matsui, Y., Shevchenko, A., and Ephrussi, A. (2004). Hrp48, a *Drosophila* hnRNPA/B homolog, binds and regulates translation of oskar mRNA. *Dev Cell* 6, 637-648.

Zhang, H.L., Eom, T., Oleynikov, Y., Shenoy, S.M., Liebelt, D.A., Dictenberg, J.B., Singer, R.H., and Bassell, G.J. (2001). Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* 31, 261-275.

Zimyanin, V.L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M.J., Clark, A., Davis, I., and St Johnston, D. (2008). In Vivo Imaging of oskar mRNA Transport Reveals the Mechanism of Posterior Localization. *Cell* 134, 843-853.

7. Authorisations